Isolierung und Charakterisierung einer thermostabilen Xylanase von Bacillus stearothermophilus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ulrike Wicker
aus Höxter-Lüchtringen

1984

Isolierung und Charakterisierung einer thermostabilen Xylanase von Bacillus stearothermophilus

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Ulrike Wicker
aus Höxter-Lüchtringen

1984

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. H. Sahm
Korreferent: Prof. Dr. C. Hollenberg
Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juli 1984

Verwendete Abkürzungen

U	Enzymeinheit (µmol/min)
ΔE	Extinktionsänderung
MG	Molekulargewicht
rpm	Umdrehungen/min
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrofokussierung
EPH	Elektrophorese
w	Gewicht
v	Volumen
%	w/v, sofern nicht anders angegeben
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DEAE	Diethylaminoethyl
TCA	Trichloressigsäure
NAD(H)	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
X	Xylose
A	Arabinose
PNXP	4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranosid
PCMB	4-Chlormerkuribenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
RSA	Rinderserumalbumin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung....1

2. Material und Methoden....4

2.1. Chemikalien....4
2.2. Herkunft der Bodenproben....5
2.3. Nährmedien zur Anzucht von *B. stearothermophilus*....5
2.4. Kulturbedingungen und Gewinnung des Kulturfiltrats....6
2.5. Ultraschallbehandlung der Zellen....7
2.6. Proteinbestimmungen....7
2.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten....9
1. Xylanase-Bestimmung....9
2. Xylosidase-Bestimmung....10
3. ß-Glukosidase-Bestimmung....11
4. Protease-Bestimmung....11
2.8. Zuckerbestimmungen....12
1. Bestimmung von Pentosen....12
2. Zuckerbestimmung mit Anthron....12
3. Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie....13
4. Quantitative Bestimmung mit einem Zuckeranalysator.13
2.9. Chromatographien....14
1. Hydroxylapatitchromatographie....14
2. Anionenaustauschchromatographie....14
3. Gelfiltration....15
4. Affinitätschromatographie....16
5. Dünnschichtchromatographie....16
2.10. Elektrophoresen....17
1. Titrationskurve....17
2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese....18
3. SDS-Gelelektrophorese....19
2.11. Aminosäureanalyse....20
2.12. Anfärbung von Polysacchariden....21

3. Ergebnisse....22

3.1. Isolierung thermophiler, Xylan-abbauender Bakterien...22
3.2. Untersuchungen zum Wachstum und zur Enzymproduktion von *B. stearothermophilus*....24
1. Einfluß der Medienzusammensetzung....24
2. Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen....25
3. Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Temperatur..27
4. Abhängigkeit der Xylanaseproduktion von der Wachstumsphase....29
5. Lokalisation der Xylanase....30
6. Aktivitätsspektrum des Kulturfiltrats....31
3.3. Reinigung der Xylanase von *B. stearothermophilus*....33
3.4. Untersuchungen zum Kohlenhydratanteil der Xylanase von *B. stearothermophilus*....37

3.5. Charakterisierung der Xylanase von *B. stearothermophilus*.....44
1. Molekulargewicht.....44
2. Aminosäurezusammensetzung.....45
3. Isoelektrischer Punkt.....47
4. pH-Optimum und pH-Stabilität.....48
5. Temperaturoptimum und -stabilität.....49
6. Einfluß von Ca^{++}-Ionen und eines SH-Reagenzes.....50
3.6. Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Xylan und Xylooligomeren.....51
1. Abbau von Xylan.....51
2. Abbau von Xylooligomeren.....53

4. Diskussion.....57

5. Zusammenfassung.....64

6. Literaturverzeichnis.....65

1. Einleitung

Pflanzliche Zellwände bestehen aus einer kristallinen Gerüstsubstanz, Cellulose, in die eine amorphe Matrix aus Hemicellulosen, Pektinen, Strukturproteinen und Lignin eingebettet ist. Der Anteil der Hemicellulosen am Gesamtzuckergehalt von Pflanzen ist unterschiedlich: Er ist groß bei einjährigen Pflanzen und Harthölzern (17 bis 32 %) und geringer bei Laubhölzern (5 bis 13 %) (Schuerch 1975, Stephen 1983). Ein Hauptbestandteil der Hemicellulosen ist Xylan, eine Gruppe von Heteropolysacchariden mit einer Hauptkette aus 50 bis 200 (Fratzke 1975) D-Xylopyranose-Einheiten. Die Verknüpfung ist bei Grünalgen β-1,3-, bei Rotalgen β-1,3- und β-1,4- und bei höheren Pflanzen β-1,4-glykosidisch (Aspinall 1983). Chanda et al. (1950) konnten ein Homoxylan aus Espartogras (*Stipa tenacissima* L.) isolieren. Solche „reinen" Xylane, die nur aus Xylose bestehen, sind extrem selten (Stephen 1983). Die meisten Xylane enthalten zusätzlich Seitenketten mit anderen Zuckern (Abb. 1).

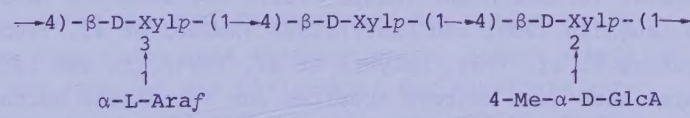


Abb. 1: Modell von Xylan aus Laubbäumen (Stephen 1983) (Xyl*p*: Xylopyranose, Ara*f*: Arabinofuranose, 4-Me-α-D-GlcA: 4-Methyl-α-D-glukuronsäure)

Neben den Substituenten 4-Methyl-α-D-glukuronsäure und L-Arabinofuranose wurden auch D-Glukuronsäure und D-Galaktose gefunden (Stephen 1983). Die Verteilung dieser Substituenten variiert von Pflanzenart zu Pflanzenart. Arabinoxylane sind hauptsächlich in Gräsern zu finden; das Verhältnis von Xylose zu Arabinose schwankt von 2 zu 1 bis 1 zu 2,4 (Schuerch 1975). Überwiegend aus Harthözern werden 4-Methyl-

α-D-glukuronoxylane isoliert; das Verhältnis von Xylose zu 4-Methyl-α-D-glukuronsäure reicht von 3:1 bis 20:1 (Schuerch 1975). In Laubbäumen ist Xylan sowohl mit Arabinose als auch mit 4-Methyl-α-D-glukuronsäure substituiert (Abb. 1). In einem Einzelorganismus ist das exakte Substitutionsmuster des Xylans vom Alter und auch der Art des entsprechenden Gewebes abhängig (Wilkie 1979). Die Variationen betreffen nicht nur die Anzahl der Substituenten und deren Anordnung sondern auch die Bindungsstelle an der Xylose (Stephen 1983).

Es ist schon lange bekannt, daß Pilze Xylan abbauen können. Fukui (1958) untersuchte den Xylanabbau bei *Aspergillus oryzae*, King und Fuller (1968) bei *Coniophora cerebella* und Eriksson und Pettersson (1971) bei *Stereum sanguinolentum*. Gorbacheva und Rodionova (1977), John et al. (1979) und Frederick et al. (1981) erforschten den Xylanabbau bei *Aspergillus niger*, Richards und Shambe (1976) bei *Cephalosporium sacchari*, Paice et al. (1978) bei *Schizophyllum commune* und Comtat (1983) bei *Sporotrichum dimorphosphorum*. Auch Bakterien können Xylan abbauen, wie *Streptomyces exfoliatus* (Sreenath und Joseph 1982), *Cellulomonas* (Rickard und Laughlin 1980) und *Bacteroides* (Howard et al. 1960, Forsberg et al. 1981, Salyers et al. 1981). In den letzten Jahren sind auch mehrere Arbeiten zum Xylanabbau durch *Bacillus*-Spezies erschienen: *B. caldarius* (Uchino und Nakane 1981, Uchino und Fukuda 1983), *B. circulans* und *B. coagulans* (Esteban et al. 1982 bzw. 1983) und *B. subtilis* (Bernier et al. 1983, Roncero 1983).

Da große Zuckermoleküle nicht in die Zellen transportiert werden können, werden Enzyme sezerniert, die das Polysaccharid extrazellulär in kleine Bruchstücke hydrolysieren. Analog zum Stärke- und Celluloseabbau (Kindl und Wöber 1975, Bisaria und Ghose 1981) sind am vollständigen Xylanabbau mehrere Enzyme beteiligt, eine oder mehrere Xylanasen und eine Xylosidase (King und Fuller 1968, John et al. 1979), die kurzkettige Xylooligomere vom nichtreduzierenden Ende

her zu Xylose hydrolysiert (Abb. 2).

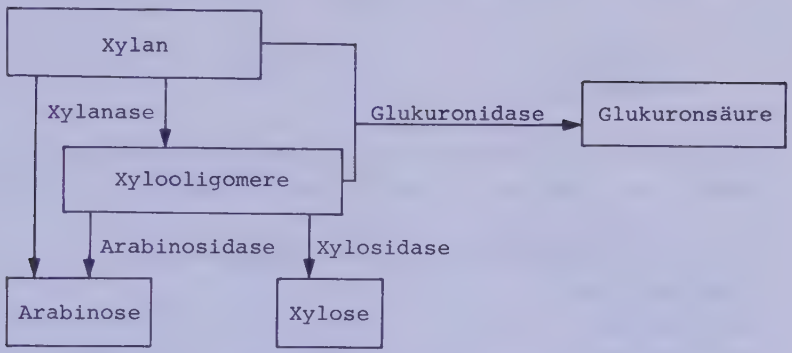


Abb. 2: Schema des enzymatischen Xylanabbaus

Arabinose wird von einigen Xylanasen (Dekker und Richards 1976, John et al. 1979) oder von Arabinosidasen abgespalten. Glukuronidasen sind bisher erst wenig untersucht worden.
Bei der enzymatischen Xylan-Hydrolyse in großtechnischem Rahmen wird die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens zum großen Teil von den Kosten für das Enzym bestimmt. Durch die Wahl von thermostabilen Enzymen ist eine Reaktionsführung bei hohen Temperaturen möglich. Dadurch wird die Gefahr von Kontaminationen zwar nicht ganz ausgeschlossen, jedoch erheblich vermindert und außerdem die Löslichkeit der Substrate verbessert. Wegen ihrer großen Stabilität werden z. B. thermostabile Amylasen bevorzugt für die enzymatische Stärkehydrolyse eingesetzt.
Obwohl auch mesophile Organismen (Temperaturoptimum < 310 K) thermostabile Enzyme synthetisieren können (Sonnleitner und Fiechter 1983), ist die Wahrscheinlichkeit größer, solche Proteine bei thermophilen Bakterien zu finden.
Das Ziel dieser Arbeit war, ein thermophiles Bakterium zu isolieren, das eine thermostabile Xylanase bildet. Dieses Enzym sollte gereinigt und charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Die Chemikalien, die nicht in der nachfolgenden Liste aufgeführt sind, wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Xylan aus Haferspelzen	Roth, Karlsruhe
Xylan aus Birke	" , "
Xylooligomere	Dr. Conrad, IBT 2, KFA Jülich
Cellulose MN 300	Macherey & Nagel, Düren
Calcofluor® White ST	Cyanamide Co., Bound Brook, USA
Lektine	Vector Lab., Burlingame, USA
Dithiothreitol	Boehringer, Mannheim
α_1-Glykoprotein 8376	Behring, Marburg
IEP-Standards	Calbiochem, Los Angeles, USA
Dextran 40	Pharmacia, Freiburg
DEAE-Sephadex A 50	" , "
MG-Standards Gelfiltration (Katalase, Rinderserumalbumin, Chymotrypsinogen)	" , "
Carboxymethylcellulose 16110	Serva, Heidelberg
Azocasein	" , "
Coomassie Brilliant Blue G 250	" , "
SDS	" , "
Desoxycholsäure	" , "
Servalyt AG 2-11	" , "
Bacto-Pepton	Difco Lab., Detroit, USA
Bacto-Agar	" , " , "
Hefeextrakt	" , " , "
Bio Gel HTP	Biorad, München
Bio Gel P 200	" , "
MG-Standards SDS-Gel	" , "
N,N'-Methylenbisacrylamid	" , "
Acrylamid	" , "

Mischbettionenaustauscher AG 501-X8(D)	Biorad, München
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	" , "
TEMED	" , "
4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranosid	Sigma, München

2.2. Herkunft der Bodenproben

Für die Anreicherung der thermophilen, Xylan-abbauenden Bakterien wurden Bodenproben aus Marudi (Stämme 7.1 und 7.3), aus Sarikei (Stämme 9.10.2 bis 9.10.5), vom Kinabalu Mountain, Sabah (Stämme 8.1 und 8.2), alle Indonesien, und von einem Komposthaufen aus dem Garten meiner Eltern in Höxter-Lüchtringen (Stämme 1978, 1979 und 1980) verwendet. Stamm 33 wurde aus einem Holzstück aus Sahna/Indien angereichert.

2.3. Nährmedien zur Anzucht von *B. stearothermophilus*

Grundmedium pH 7, 100 ml:

300 mg $(NH_4)_2SO_4$
100 mg $NaNO_3$
100 mg Hefeextrakt
50 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
1 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$
0,5 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$
7 mg $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$
5 ml 1 M KH_2PO_4 pH 7
1 g Kohlenstoffquelle (gemörsertes Xylan aus Haferspelzen wurde direkt in die Erlenmeyerkolben eingewogen; lösliche Kohlenstoffquellen wurden 10 % (w/w) in H_2O separat autoklaviert und nachträglich zugegeben)

DSM-Medium (Claus et al. 1983):

5 g Bacto-Pepton/l
3 g Fleischextrakt/l

Beide Medien wurden 20 min bei 393 K autoklaviert.

Rowe-Medium (Rowe et al. 1975) pH 7,3 100 ml:

10 mg Isoleucin
5,2 mg Methionin
5 mg L-Glutamat
4,2 mg L-Histidin
0,1 mg Biotin
0,1 mg Nikotinsäure
100 mg NH_4Cl
100 mg NaCl
4 mg $MgSO_4$
0,5 mg $CaCl_2$
0,5 mg $ZnSO_4$
12,6 µg $MnCl_2$
5 µg $FeCl_3$
5 ml KH_2PO_4 pH 7,3 (25 % K_2HPO_4, 6 % KH_2PO_4)
steril filtrieren in sterilen Erlenmeyerkolben mit 1 g Xylan

2.4. Kulturbedingungen und Gewinnung des Kulturfiltrats

Die Stammhaltung erfolgte auf Schrägagarröhrchen (Grundmedium + 2 % Agar + 1 % Xylan) bei Raumtemperatur. Alle acht bis zehn Wochen wurde neu überimpft und 24 Stunden bei 333 K inkubiert.
Die Vor- und Hauptkulturen wurden submers auf einer rotierenden Schüttelmaschine (100 rpm) in Grundmedium + 1 % Xylan bei 333 K gezüchtet. Für 100 ml Medium wurden 500 ml-, für 400 ml Medium 2 l-Erlenmeyerkolben mit zwei Einbuchtungen verwendet. Je 100 ml Hauptkultur wurden mit 1 ml einer Vor-

kultur in der stationären Phase (12 h 333 K, ∿ 10^9 Sporen/ml) beimpft. Die Zell- bzw. Sporenzahl wurde mit einer Thomakammer durch Auszählen ermittelt.
Das Kulturfiltrat wurde als klarer Überstand durch Zentrifugation der Kultursuspension in einer Beckman J 21 C-Zentrifuge, JA 10-Rotor (10000 rpm ≙ max. 17680 x g) gewonnen.

2.5. Ultraschallbehandlung der Zellen

Um die Lokalisation der Xylanase zu untersuchen, wurden die Zellen und das unlösliche Xylan, die bei der Zentrifugation der Kultursuspension sedimentierten, zweimal in 50 mM KH_2PO_4 pH 7 gewaschen und resuspendiert. Anschließend wurden sie 30 sec mit einem Branson Sonifier B 15 (Standard-1/2"-Rüssel; etwa 150 W) beschallt.

2.6. Proteinbestimmungen

2.6.1. Bestimmung des Proteingehalts von ganzen Zellen

Der Proteingehalt ganzer Zellen wurde nach NaOH-Aufschluß (Herbert et al. 1971) durch Nachweis nach Bradford (1976) bestimmt.
Die Zellen von 5 ml Kultursuspension wurden mit je 5 ml 50 mM KH_2PO_4 pH 7 gewaschen und in 2 ml 50 mM KH_2PO_4 pH 7 resuspendiert. Von der Suspension wurden 67 µl abgenommen und mit 33 µl 1 N NaOH vermischt. Die Zellen wurden durch 1 min Kochen aufgebrochen. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde die Proteinlösung durch die Zugabe von 5 ml Bradford-Reagenz (1:5 mit H_2O verdünnt) angefärbt. Nach 2 min erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm mit einem Zeiss-Spektralphotometer PM 6. Aus der Eichkurve ließ sich der Proteingehalt berechnen: Eichkurve mit Rinderserumalbumin: $\Delta E_{595} = 1 \triangleq 3{,}36$ mg RSA/ml (Protein-

lösung). Die Kurve verläuft linear für $0,05 < \Delta E_{595} < 0,3$
Bradford-Reagenz: Protein Assay Dye Reagent Concentrate

2.6.2. Bestimmung des Proteingehalts nach Bensadoun und Weinstein

Die Proteinbestimmung nach Bensadoun und Weinstein (1976) wurde für das Kulturfiltrat und die Fraktionen nach Hydroxylapatit angewendet. Da das Kulturfiltrat sehr viele Zucker enthielt, welche die Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) störten, wurde das Protein zuerst durch Trichloressigsäure (TCA) gefällt.
1 ml Proteinlösung wurde mit 50 µl 0,3 % Na-Desoxycholat 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden mit 0,2 ml 36 % TCA gefällt und 15 min in der Eppendorf-Zentrifuge mit 10000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 ml Cu-Tartrat-Reagenz aufgenommen und nach 10 min bei Raumtemperatur mit 0,1 ml Folin-Ciocalteus-Reagenz (1:2 mit H_2O verdünnt) vermischt. Nach 30 min Stehen im Dunkeln wurde die Extinktion bei 750 nm gemessen.
Aus der Eichkurve mit Rinderserumalbumin: $\Delta E_{750} = 1 \triangleq 0,09$ mg RSA/ml (Proteinlösung)
Die Kurve verläuft linear für $0,05 < \Delta E_{750} < 0,4$
Cu-Tartrat-Reagenz: 50 Teile Lösung I: 8 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH + 1 Teil Lösung II: 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ + 1 g K-Na-Tartrat in 100 ml 0,1 N NaOH

2.6.3. Bestimmung des Proteingehalts nach Warburg und Christian

Der Proteingehalt angereicherter Xylanaselösungen nach DEAE-Sephadex A 50-Chromatographie wurde nach der Methode von Warburg und Christian (1942) bestimmt. Bei dieser Proteinbestimmung wird die Extinktion bei 280 nm bestimmt und angenommen, daß das untersuchte Protein so viele aromatische

Aminosäuren enthält wie die Enolase, die Warburg und Christian (1942) ihrer Berechnung zu Grunde legten. Die Extinktionsmessung bei 260 nm erfolgt, um Verunreinigungen durch Nukleinsäuren auszugleichen.
Der Proteingehalt wird berechnet nach der Formel:

$$(\Delta E_{280} \cdot 1{,}55) - (\Delta E_{260} \cdot 0{,}75) = \text{mg Protein/ml}$$

Zu beachten ist, daß die Proteinlösung weitgehend entsalzt sein muß.

2.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.7.1. Xylanase-Bestimmung

Die Xylanaseaktivität wurde über den Nachweis gebildeter reduzierender Zucker nach Nelson (1944) und Somogyi (1952) bestimmt.
Reaktionsansatz (0,5 ml):

0,45 ml 1 % Xylan (Haferspelzen) in 50 mM KH_2PO_4 pH 7
0,05 ml Enzymlösung

Nach 20 min bei 333 K wurde mit 0,5 ml einer Mischung aus 25 Teilen Nelson-Lösung A und 1 Teil Nelson-Lösung B die Reaktion gestoppt und der Reaktionsansatz 20 min gekocht. Nach Abkühlen im Eis wurden 0,5 ml Nelson-Lösung C dazugegeben, sofort vermischt und nach 10 min mit 11 ml H_2O aufgefüllt. Die Extinktion wurde bei 520 nm gemessen. Aus der Eichkurve mit Xylose: $\Delta E_{520} = 1 \triangleq 0{,}57$ mg Xylose/ml $\triangleq$ 3,8 µmol/ml (Xyloselösung). Die Kurve verläuft linear für $0{,}1 < \Delta E_{520} < 0{,}6$. 1 Enzymeinheit (U) = 1 µmol Xyloseäquivalent/min
Dieser Test wurde auch mit den Substraten Dextran 40, Stärke und Carboxymethylcellulose (CMC) durchgeführt.
Lösungen: 1 % Xylanlösung: 1 g gemörsertes Haferspelzenxylan wurde mit 60 ml 50 mM KH_2PO_4 pH 7 vermischt und 10 min mit etwa 150 W ultrabeschallt (John et al. 1979), um die Xylanpartikel gut zu ver-

teilen. Die milchige Suspension wurde mit 40 ml 50 mM KH_2PO_4 pH 7 aufgefüllt.

Nelson-Lösung A (verändert nach Stüttgen 1981):

25 g Na_2CO_3
25 g K-Na-Tartrat und
20 g $NaHCO_3$ werden in 800 ml H_2O gelöst und mit 200 ml H_2O aufgefüllt.

Nelson-Lösung B:

15 g $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$ wurden in 100 ml H_2O gelöst und mit 2 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 versetzt.

Nelson-Lösung C:

25 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4\ H_2O$ wurden in 450 ml H_2O gelöst und mit
21 ml konzentrierter H_2SO_4 vermischt.
3 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7\ H_2O$ wurden in 25 ml H_2O gelöst.
Beide Lösungen wurden vermischt und 24 bis 48 Stunden bei 310 K inkubiert. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur in einer braunen Flasche aufbewahrt.

2.7.2. β-Xylosidase-Bestimmung

Die β-Xylosidaseaktivität wurde mit dem Substrat 4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranosid (PNXP) bestimmt. Die PNXP-Spaltung wird als Zunahme der 4-Nitrophenol-Konzentration durch Messung der Extinktion bei 405 nm verfolgt.
Reaktionsansatz (1,5 ml):

1 ml 20 mM PNXP in 50 mM KH_2PO_4 pH 7
0,5 ml Enzymlösung

Nach 20 min Inkubation bei 333 K wurde die Reaktion durch Abkühlen des Reaktionsansatzes im Eisbad gestoppt und die Extinktion bei 405 nm gemessen. Aus der Eichkurve mit 4-Nitrophenol: $\Delta E_{405} = 1 \triangleq 0{,}16$ µmol 4-Nitrophenol/ml (Küvettenvolumen).
Die Kurve verläuft linear für $0{,}05 < \Delta E_{405} < 0{,}6$
1 Enzymeinheit (U) = 1 µmol 4-Nitrophenol/min

2.7.3. β-Glukosidase-Bestimmung

Die β-Glukosidaseaktivität wurde über die Zunahme der freigesetzten Glukose bestimmt.
Reaktionsansatz (1 ml):

0,1 ml 10 mM Cellobiose
0,8 ml 50 mM KH_2PO_4 pH 7
0,1 ml Enzymlösung

Nach 20 min bei 333 K wurde der Reaktionsansatz im Eisbad abgekühlt und der Glukosegehalt nach Banauch et al. (1975) bestimmt. Da bei der Oxidation der Glukose zu Glukonolakton durch die Glukose-Dehydrogenase pro mol ein mol NAD reduziert wird, kann durch eine Endpunktbestimmung des gebildeten NADH auf die ursprünglich vorhandene Glukose-Konzentration zurückgerechnet werden.
0,1 ml Glukoselösung wurden mit 1 ml Glukose-Reagenz („System Glukose") vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 340 nm gemessen.
$\Delta E_{340} = 1 \triangleq 3{,}46$ mg Glukose/ml $\triangleq$ 19 µmol Glukose/ml (Glukoselösung)
1 Enzymeinheit (U) = 2 µmol Glukose/min

2.7.4. Protease-Bestimmung

Die Proteaseaktivität wurde mit dem Substrat Azocasein nach Prestidge et al. (1971) und Nakane (1978) bestimmt.
Reaktionsansatz (0,6 ml):

0,5 ml Azocasein in 50 mM KH_2PO_4 pH 7
0,1 ml Enzymlösung

Die Reaktion wurde nach 20 min bei 333 K mit 2 ml 10 % TCA gestoppt, das ausgefällte Protein abzentrifugiert und der Überstand mit 0,3 ml 10 mM NaOH alkalisiert. Die Extinktion wurde bei 430 nm gemessen.

2.8. Zuckerbestimmungen

Die Bestimmung reduzierender Zucker nach Nelson (1944) und Somogyi (1952) wurde bereits unter 2.7.1. und die Glukosebestimmung nach Banauch et al. (1975) unter 2.7.3. beschrieben.

2.8.1. Bestimmung von Pentosen

Die Pentosen in hydrolysierten Kultursuspensionen wurden nach Dische und Borenfreund (1957) durch Phloroglucin spezifisch angefärbt.
Dazu wurde 1 ml Kultursuspension mit 36 µl 72 % H_2SO_4 versetzt und 1 Stunde bei 393 K hydrolysiert.
0,2 ml Pentoselösung wurde mit 2,5 ml Reagenz 15 min gekocht. Nach dem Abkühlen im Eisbad wurde die Extinktion bei 552 nm gemessen.
Aus der Eichkurve mit Xylose: $\Delta E_{552} = 1 \triangleq 0{,}25$ mg Xylose/ml (Xyloselösung)
Die Kurve verläuft linear für $0{,}2 < \Delta E_{552} < 0{,}7$
Phloroglucin-Reagenz: 110 ml Eisessig, 2 ml konz. HCl, 1 ml 0,8 % Glukose und 5 ml 5 % Phloroglucin (in etwas Ethanol angelöst) wurden vermischt.

2.8.2. Zuckerbestimmung mit Anthron

Die mit der Xylanase assoziierten Zucker wurden nach Herbert et al. (1971) bestimmt. Durch Kochen in Säure werden Polysaccharide hydrolysiert und die Monomere in Furfurale überführt, die durch Kondensation mit Anthron gefärbt werden.
Die Lösungen wurden eisgekühlt in gekühlte Gläser pipettiert. Zu 0,5 ml Zuckerlösung wurden 2,5 ml Anthronreagenz pipettiert, 15 min gekocht und im Eisbad abgekühlt. Bei Raumtemperatur wurden die Proben gemischt und die Extinktion bei 625 nm gemessen.

Aus der Eichkurve mit Glukose: $\Delta E_{625} = 1 \triangleq 25$ µg Glukose/ml (Küvettenvolumen)

2.8.3. Bestimmung mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Zusammensetzung von Haferspelzenxylan wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Dazu wurden 2,5 ml einer 4 % Xylanlösung mit 2,5 ml 1 N H_2SO_4 versetzt und 4 Stunden bei 373 K im Ölbad inkubiert (Schraubdeckelglas). Die Lösung wurde mit 1,1 g $BaCO_3$ neutralisiert.
Die Zucker wurden über ein Kationenaustauscherharz in Ca-Form (Biorad: Aminex Carbohydrate HPX 42) in einem HPLC-Gerät (Hewlett-Packard 1084 B) (Durchflußrate 0,5 ml/min; Säulentemperatur 358 K; Eluent H_2O 353 K; 45 min) aufgetrennt und mit einem Differentialrefraktometer (Knauer, 308 K) detektiert.

2.8.4. Quantitative Bestimmung mit einem Zuckeranalysator

Die Auftrennungen von Zuckern in Boratform erfolgten nach Khym und Zill (1951) mit Biotronik-Geräten ZA 5100 über Säulen, die mit einem Anionenaustauscherharz (Aminex DA-X4-20) gefüllt waren (Länge 30 cm, Ø 6 mm, 333 K). Die Elutionen erfolgten durch Boratpuffer-Gradienten pH 8,0 bis 9,45 und 0,1 bis 0,5 M.
Der Nachweis der Zucker im Eluat erfolgte entweder durch 1. das Reagenz Bicinchoninat, mit dem reduzierende Zucker nachgewiesen und Zuckeroligomere nicht gespalten werden, oder durch 2. das Reagenz Orcin/H_2SO_4, mit dem Furanbildner nachgewiesen und Zuckeroligomere hydrolysiert werden.

Für die Bestimmung der an die Xylanase gebundenen Zucker wurde 1 ml Enzymlösung mit 0,3 ml 8 M HCl 1 Stunde bei

373 K im Ölbad inkubiert (Schraubdeckelglas). Die Lösung wurde mit 190 mg $NaHCO_3$/ml neutralisiert und mit dem Zuckeranalysator 1 analysiert.

2.9. Chromatographien

2.9.1. Hydroxylapatitchromatographie

Zur Adsorption der Xylanase wurden pro 100 ml Kulturfiltrat 10 g Hydroxylapatit (Bio Gel HTP) zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation wurde der überwiegende Teil des Überstandes abpipettiert und das beladene Hydroxylapatit in eine Säule (Ø 5 cm) gegeben. Nachdem es sich gut abgesetzt hatte, wurde mit 0,1 M KH_2PO_4 pH 7 bei 277 K gewaschen (zweifaches Säulenvolumen). Die Durchflußrate betrug 80 ml/h. Anschließend wurde die Xylanase mit einem KH_2PO_4-Gradienten pH 7 von 0,1 bis 0,5 M eluiert und in Fraktionen gesammelt.

2.9.2. Anionenaustauschchromatographie

Mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 4,9 ist die Xylanase aus *B. stearothermophilus* im höheren pH-Bereich negativ geladen. Deshalb konnte das Enzym bei pH 8 an den Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A 50 adsorbiert werden. Da mit dieser Art von Austauschern dann gute Ergebnisse erzielt wurden, wenn die flüssige Phase durch Tris gepuffert wurde, wurde die durch Hydroxylapatit vorgereinigte Xylanaselösung durch Ultrafiltration (PM 10-Membran, Amicon) auf etwa 1/20 konzentriert und mit 0,1 M Tris/HCl pH 8 1:10 verdünnt (Beispiel: 300 ml auf 15 ml, + 135 ml Tris/HCl pH 8). Diese Xylanaselösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 80 ml/h auf eine äquilibrierte DEAE-Sephadex A 50-Säule (Ø 5 cm, 20 cm lang; 0,1 M Tris/HCl pH 8, 277 K) aufgetragen. Nachdem mit etwa dem doppelten Säulenvolumen gewaschen worden

war, wurde die Xylanase durch einen Tris/HCl-Gradienten pH 8 von 0,1 bis 0,5 M eluiert und in Fraktionen à 5,4 ml gesammelt.

2.9.3. Gelfiltration

2.9.3.1. Fractogel

Die Trennung von Zuckern und Xylanase erfolgte über eine Fractogel TSK HW-55 (S)-Säule (Hamacher 1983) (Ø 2,5 cm, etwa 2 m lang, 333 K). Auf die äquilibrierte Säule (70 ml 0,02 % NaN_3/h) wurden 4,8 ml Enzymlösung mit einem Gesamtproteingehalt von 13 mg aufgetragen und eluiert. Ein Differentialfefraktometer detektierte die aufgetrennten Substanzen.

2.9.3.2. Bio Gel P 200

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Xylanase aus *B. stearothermophilus* erfolgte über eine Bio Gel P 200-Säule (Ø 2,5 cm, 93 cm lang, 277 K). Auf die äquilibrierte Säule (9,5 ml McIlvaine-Puffer pH 6,8/h) wurden 5,65 ml Proteinlösung aufgetragen (18 U Xylanase in 5 ml McIlvaine-Puffer pH 6,8 + 0,65 ml Glyzerin), eluiert und in Fraktionen gesammelt.

McIlvaine-Puffer pH 6,8 (McIlvaine 1921): 22,75 ml 0,1 M Zitronensäure wurden mit 77,25 ml 0,2 M Na_2HPO_4 vermischt.

2.9.4. Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie der Xylanase von *B. stearothermophilus* wurde mit Agarose-fixierten Lektinen durchgeführt. Es wurden je 0,5 ml von Lektin-Agarose-Suspensionen verschiedener Zuckerspezifität eingesetzt. Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens wurden 250 µl Xylanaselösung (125 µg Protein, 0,7 U) dazugegeben und nach 30 min bei Raumtemperatur die verbliebene Xylanaseaktivität im Überstand getestet. Zur Lösung der Bindung zwischen Xylanase und *Ulex europeus*-Lektin wurden bis zu 7,5 % Fukoselösungen benutzt.

2.9.5. Dünnschichtchromatographie

Durch Dünnschichtchromatographie wurden die mit der Xylanase assoziierten Zucker identifiziert. Da das Hydrolysat (siehe 2.8.4.) zuviel Salz enthielt, wurde es zuerst durch einen Mischbettionenaustauscher (AG 501-X8(D)) entsalzt.
Dazu wurde 1 g des Ionentauschers in eine kleine Säule (Ø 1 cm) eingefüllt und mit 10 ml H_2O gewaschen. 3 ml der exakt auf pH 7 eingestellten Probe wurden aufgetragen und mit H_2O eluiert. Bei einem Volumen von 5,2 ml war die Salzkonzentration ungefähr äquivalent mit 0,04 M NaCl (Leitfähigkeitsmeßgerät Radiometer Kopenhagen CDM 83).
45 µl dieser Probe (∿ 75 nmol Zucker) wurden auf eine Kieselgel-60-Fertigplatte (0,25 mm) mit Fluoreszenzindikator (Merck) aufgetragen; parallel dazu je 25 µl ≙ 25 nmol von Referenzzuckern.
Als Laufmittel wurden 190 ml eines Gemischs von 1-Butanol, 2-Propanol und H_2O im Verhältnis 3:12:4 verwendet (Kanaya et al. 1978).
Nach etwa 5 Stunden war die Auftrennung beendet und das Chromatogramm wurde nach Trocknen mit Naphthoresorcin-Reagenz besprüht und 10 bis 15 min bei 373 bis 378 K entwickelt.

2.10.2. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für diese und die unter 2.10.3. beschriebene Methode wurde ein Plattengel-Elektrophoresegerät von Biorad, Modell 220, benutzt. Die Gele für beide Verfahren waren 1,5 mm dick. Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde in einem Trennsystem nach Maurer (1971), modifiziert von Jaeger (1980), durchgeführt.

Für das Trenngel wurden 5 ml Lösung 1,
9,5 ml Lösung 2,
5,5 ml H_2O und
20 ml Lösung 3 gemischt.

Für das Sammelgel wurden 1 ml Lösung 4,
2 ml Lösung 5,
4 ml H_2O und
1 ml Lösung 6 gemischt. Die Polymerisation erfolgte durch Belichtung mit UV-Strahlen.

Die Proben wurden durch Ultrafiltration (PM 10-Membran, Amicon) bis zu einem Proteingehalt von etwa 0,25 mg/ml eingeengt. 100 µl dieser Proben wurden mit je 10 µl 0,5 % Bromphenolblau in Glyzerin versetzt und in je eine ausgesparte Tasche eingefüllt.

Als Elektrodenpuffer wurde ein 10 fach verdünnter Tris/Glycin-Puffer pH 8,3 verwendet.

Die angelegte Spannung betrug 200 V. Das Gel wurde mit Wasser gekühlt.

Lösung 1: 48 ml 1 N HCl, 36,3 g Tris, 0,23 ml TEMED und H_2O in 100 ml

Lösung 2: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung 3: 0,14 % Persulfat

Lösung 4: 48 ml 1 N HCl, 5,98 g Tris, 0,46 ml TEMED und H_2O in 100 ml

Lösung 5: 12 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung 6: 4 mg Riboflavin in 100 ml H_2O (in brauner Flasche aufbewahren)

Tris/Glycin-Puffer pH 8,3: 0,6 % Tris, 2,88 % Glycin

Proteinfärbung

Nach der Auftrennung wurden die Gele nach Fairbanks et al. (1971), modifiziert von Stüttgen (1981), über Nacht gefärbt. Die Färbelösung enthielt 0,05 % Coomassie-Brilliant Blue G 250, 10 bzw. 25 % (v/v) 2-Propanol (2- bzw. 1-dimensional) und 10 % (v/v) Essigsäure. Der Farbstoffüberschuß wurde durch Waschen mit 10 % (v/v) Essigsäure entfernt.

Zuckerfärbung

Die Zucker wurden nach der gelelektrophoretischen Auftrennung nach Zacharius et al. (1969) gefärbt.
Dazu wurden die Gele 30 min in etwa 200 ml 12,5 % TCA fixiert und anschließend fünfmal mit etwa 200 ml H_2O gewaschen. Zur Oxidation der freien Hydroxylgruppen der Zucker wurden die Gele 50 min in 1 % Perjodsäure in 3 % (v/v) Essigsäure inkubiert. Um das Oxidationsmittel zu entfernen, wurden die Gele über Nacht mit H_2O gewaschen. Die Anfärbung der Aldehyde erfolgte mit 250 ml Schiff-Reagenz (basisches Fuchsin, Na-Disulfit, HCl) in 50 min. Restliches Perjodat wurde durch dreimal je 10 min Waschen mit 0,5 % Na-Disulfit reduziert. Die Gele wurden noch einmal mit H_2O gespült und anschließend in 7 % (v/v) Essigsäure aufbewahrt.

2.10.3. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli und Favre (1973) durchgeführt.

Für das Trenngel wurden 10,23 ml Lösung 1,
6,25 ml Lösung 3,
25 µl TEMED,
8,2 ml H_2O und
350 µl 10 % Ammoniumpersulfat gemischt.

Naphthoresorcin-Reagenz (Krebs et al. 1969): Gleiche Teile von 0,2 g Naphthoresorcin (= Naphthalindiol-1,3) in 100 ml Ethanol und 20 % H_2SO_4

2.10. Elektrophoresen

2.10.1. Titrationskurve

Die Titrationskurve der Xylanase im Polyacrylamid-Gel wurde durch eine zweidimensionale Technik mit einem LKB 2117 Multiphor-Gerät erhalten (Righetti und Gianazza 1980, LKB 1981, Sprey und Lambert 1983).
In der ersten Dimension wurde ein pH-Gradient in einem Polyacrylamidgel auf silanisierten Glasplatten durch Elektrofokussierung der Ampholyte (Servalyt pH 2-11) aufgebaut (283 K, 50 min, V und A maximal). Die Elektrodenstreifen wurden entfernt und die Probe (100 µl mit 100 bis 400 µg Protein) in eine Aussparung senkrecht zum pH-Gradienten aufgetragen. Die Proteine wurden im elektrischen Feld in der 2. Dimension senkrecht zur 1. aufgetrennt (20 min, 15 mA, 300 V, 283 K). Der isoelektrische Punkt liegt bei dem pH der Schnittstelle der Titrationskurve mit der Aussparung. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit 300 ml 20 % TCA in 1 Stunde fixiert, in 10 % (v/v) 2-Propanol + 10 % (v/v) Essigsäure gewaschen und mit Coomassie gefärbt (siehe 2.10.2.).

Polyacrylamidgel: 5 ml 29,1 % Acrylamid
5 ml 0,9 % N,N'-Methylenbisacrylamid
1,8 ml Servalyt AG 2-11
ad 30 ml H_2O
30 µl 40 % Ammoniumpersulfat
5 µl TEMED

Elektrolyte: Kathode 1 M NaOH
Anode 1 M H_3PO_4

Für das Sammelgel wurden 3,25 ml Lösung 1,
6,25 ml Lösung 2,
25 µl TEMED,
15,2 ml H_2O und
250 µl 10 % Ammoniumpersulfat gemischt.

Nach Konzentrierung der Proben durch Ultrafiltration (PM 10-Membran, Amicon) bis zu einem Proteingehalt von etwa 1 mg/ml, wurden 30 µl mit 70 µl Lösung 5 3 min gekocht, mit je 10 µl 0,5 % Bromphenolblau in Glyzerin vermischt und in die ausgesparten Geltaschen gefüllt. Elektrodenpuffer war Lösung 4. Die angelegte Spannung betrug 60 V für das Sammelgel und 120 V für das Trenngel. Das Gel wurde mit Wasser gekühlt und nach der Elektrophorese gefärbt wie unter 2.10.2. beschrieben.

Lösung 1: 30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid
Lösung 2: 6 % Tris, 0,4 % SDS, mit HCl auf pH 6,8 einstellen
Lösung 3: 18,2 % Tris, 0,4 % SDS, mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Lösung 4: 0,6 % Tris, 2,88 % Glycin, 0,1 % SDS, mit HCl auf pH 8,3 einstellen
Lösung 5: 0,12 % Tris, 0,029 % EDTA, 1 % SDS, 5 % (v/v) Mercaptoethanol, mit HCl auf pH 8 einstellen

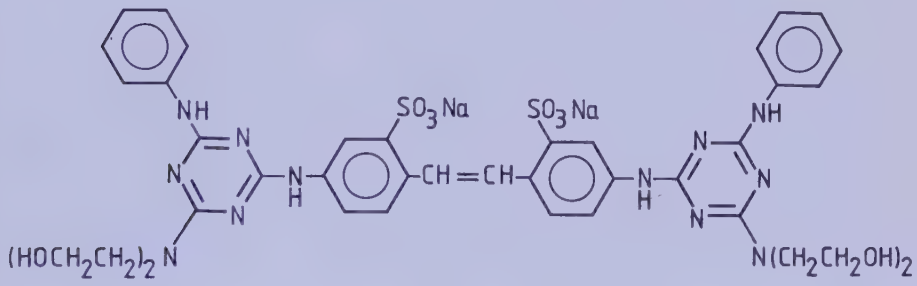
2.11. Aminosäureanalyse

Die Hydrolyse der Xylanase erfolgte im Vakuum, um Oxidationen der freiwerdenden Aminosäuren zu vermeiden. 0,2 ml Xylanaselösung (etwa 0,3 mg Protein) wurde mit 0,2 ml konz. HCl unter Schütteln vermischt und in flüssigem N_2 eingefroren, evakuiert, im Vakuum aufgetaut und erneut eingefroren. Nachdem beim Auftauen keine Blasen mehr entstanden, wurden die Röhrchen im Vakuum zugeschmolzen und die Proben 24, 48 bzw. 72 Stunden bei 378 K im Ölbad hydrolysiert. Anschliessend wurden die Röhrchen geöffnet, im Exsikkator getrocknet und bis zur Aminosäureanalyse in einem Biotronik AS-Ana-

lysator Modell LC 6000 E eingefroren.

2.12. Anfärbung von Polysacchariden

Der Fluoreszenzfarbstoff Calcofluor® White ST ist ein „Stilben-Derivat, das sich an freie Hydroxylgruppen von geradkettigen Polysacchariden anlagert" (Haigler und Benziman 1982).



Für die Färbung der Polysaccharide, die von *B. stearothermophilus* beim Wachstum auf Monosacchariden gebildet wurden, wurden etwa 10 ml Kultursuspension mit 1 ml 0,01 % Calcofluor® White ST kurz inkubiert und abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit H_2O gewaschen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung thermophiler, Xylan-abbauender Bakterien

Thermophile Bakterien kommen überall auf der Erde vor (Allen 1953, Singleton und Amelunxen 1973) und entwickeln sich dort besonders gut, wo sie günstige Bedingungen vorfinden, z. B. in Gebieten mit hoher vulkanischer oder geothermaler Aktivität, in Sonnen-erhitzten Böden und Flachwasserbereichen und in sich selbsterhitzenden Systemen wie Kompost- und Heuhaufen (Zeikus 1979, Zuber 1979).
Um thermophile Bakterien anzureichern, die Xylan abbauen können, wurden Bodenproben tropischer Wälder und Kompost 24 Stunden bei 323 bzw. 333 K in Grundmedium (1 % Xylan) inkubiert. Die Isolierung der Stämme erfolgte durch Ausstreichen der Zellsuspensionen auf Agarplatten (1 % Xylan). Nach einem Tag bei 323 bzw. 333 K konnten Xylanase-produzierende Stämme an einem die Kolonie umgebenden klaren Abbauhof erkannt werden (Abb. 3).

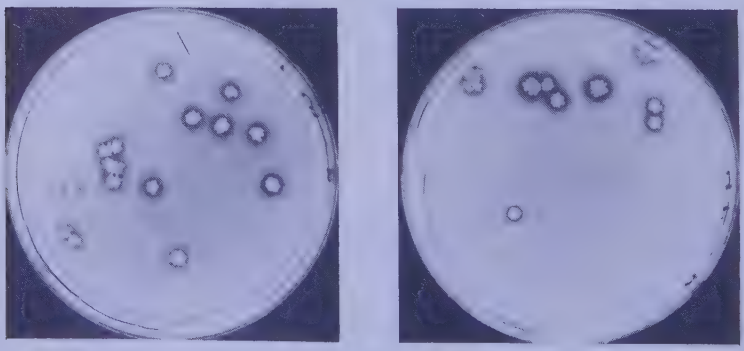


Abb. 3: Kolonien von isolierten Bakterienstämmen mit sie umgebenden Abbauhöfen (links: Stamm 9.10.2, rechts: Stamm 8.2; 24 h bei 323 K auf 1 % Xylan

Mehrmals wurden glänzende, nach außen hin verdickte Kolonien mit glattem Rand und je einmal andere Formen (Abb. 3) gefunden. Bei allen isolierten Stämmen handelte es sich um sporenbildende Stäbchen.
Von den Isolaten schied Stamm 1980, 60 die größte Xylanaseaktivität in das Grundmedium aus (Tab. 1). Er wurde von

Stamm	Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat (mU/ml)
7.1	39
7.3	34
8.1	16
8.2	92
9.10.2	4
9.10.3	17
9.10.4	16
9.10.5	0
1978	46
1979	41
1980.1	69
1980.4	8
33, 60	24
1978, 60	14
1979, 60	54
1980, 60	106

Tab. 1: Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat isolierter Bakterienstämme nach 12 h Wachstum bei 323 bzw. 333 (60) K auf 1 % Xylan

Herrn Dr. Claus (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen DSM) als *B. stearothermophilus* identifiziert. Die Zellen sind 3 bis 6 µm lang und 0,6 bis 0,8 µm breit. Sie können anaerob mit Nitrat wachsen. Die Sporenmutterzellen sind bei diesem Stamm nur sehr selten angeschwollen, was ungewöhnlich für *B. stearothermophilus* ist (Claus 1982).
Mit Stamm 1980, 60 wurden alle weiteren Experimente durchgeführt.

3.2. Untersuchungen zum Wachstum und zur Enzymproduktion von *B. stearothermophilus*

3.2.1. Einfluß der Medienzusammensetzung

Nachdem *B. stearothermophilus* für die weiteren Arbeiten gewählt worden war, wurde das Wachstum auf Medien aus der Literatur untersucht: einmal das von der DSM für dieses Bakterium vorgeschlagene, zum anderen das von Rowe et al. (1975) optimierte, das sich durch definierte Zusammensetzung von Aminosäuren und Vitaminen vom Grundmedium unterschied. Außerdem wurde die Hefeextraktkonzentration im Grundmedium variiert und Bactopepton in unterschiedlichen Mengen hinzugefügt (Tab. 2). *B. stearothermophilus* wuchs

Medium	Proteingehalt der Zellsuspension	Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat	Pentoseabnahme in der Kultursuspension
	(mg/ml)	(U/ml)	(%)
Grundmedium	0	0	0
+ 0,05 % HE	1,0	0,1	45
+ 0,10 % HE	1,4	0,2	65
+ 0,15 % HE	1,5	0,2	63
+ 0,20 % HE	1,5	0,2	67
+ 0,25 % HE	1,6	0,2	67
+ 0,10 % BP	1,4	0,1	0
+ 0,15 % BP	1,0	0,1	33
+ 0,20 % BP	1,1	0,1	45
DSM-Medium	0,1	0	0
Rowe-Medium	0	0	0

Tab. 2: Einfluß der Medienzusammensetzung auf das Wachstum, die Xylanaseproduktion und den Xylanabbau von *B. stearothermophilus* (HE: Hefeextrakt; BP: Bacto-Pepton; 12 h bei 333 K auf 1 % Xylan)

nicht in den beiden der Literatur entnommenen Medien, weil es sich vermutlich um einen anderen Stamm handelte. Er wuchs auch nicht im Grundmedium ohne Hefeextrakt.

Sowohl für das Wachstum als auch für die Xylanaseproduktion wurden mit 0,1 % Hefeextrakt die jeweils höchsten Werte erreicht, 1,4 mg Protein/ml Zellsuspension bzw. 0,2 U/ml Kulturfiltrat. Auch die Verwertung des Xylans war mit einer Abnahme der Pentosen um 65 % maximal. Die Medien für die weiteren Versuche enthielten deshalb alle 0,1 % Hefeextrakt. Das Maß für die Xylanverwertung war die Abnahme der Pentosen in der hydrolysierten Kultursuspension, denn nur so war es möglich, das gesamte Xylan zu bestimmen. Eine Messung der Abnahme des unlöslichen Polysaccharids über das Trockengewicht würde durch die Einbeziehung der Zellen ebenso verfälscht wie der Verbrauch der gelösten Xylooligomere durch die vergrößerte Löslichkeit der kürzer werdenden Ketten. Deshalb war es vorteilhaft, die lösliche und die unlösliche Fraktion gleichzeitig zu bestimmen. Es konnte angenommen werden, daß die gemessenen Pentosen aus dem Xylan stammten, weil hydrolysierte Zellen, die auf Stärke gewachsen waren, nur 34 µg Pentosen/ml Kultursuspension enthielten (Kohlenstoffquelle war Stärke, weil beim Wachstum auf Monosacchariden Exopolysaccharide gebildet werden (Abb. 4)).

3.2.2. Wachstum und Enzymproduktion auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

B. circulans bildete nur beim Wachstum auf Xylose eine Xylanase (Esteban et al. 1982). Um zu untersuchen, ob *B. stearothermophilus* mit anderen Substraten als Xylan eine Xylanase produzierte, wurden ihm verschiedene Kohlenstoffquellen angeboten und die Enzymbildung geprüft. Parallel dazu wurde das Verhalten von *B. amyloliquefaciens* untersucht. Im Gegensatz zu *B. stearothermophilus*, der nur mit Xylan eine Xylanase bildete, schied *B. amyloliquefaciens* beim Wachstum auf allen geprüften Kohlenstoffquellen eine Xylanase aus (Tab. 3).

C-Quelle	*B. stearothermophilus*		*B. amyloliquefaciens*	
	Zellzahl (10^8/ml)	Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat (U/ml)	Zellzahl (10^8/ml)	Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat (U/ml)
Kontrolle	1,9	0	0,8	0,6
Glyzerin	7,4*	0	7,0	0,6
Glukose	4,8*	0	3,2	0,3
Mannit	6,8*	0	17,0	0,4
Xylose	7,7*	0	0,9	0,4
Xylan	13,0	0,2	3,9	0,4
Dextran 40	2,2	0	1,0	0,6
Stärke	7,3	0	23,0	0,8
Cellulose MN 300	2,6	0	1,1	0,7

Tab. 3: Vergleich des Wachstums und der Xylanaseproduktion auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen von *B. stearothermophilus* und *B. amyloliquefaciens* (*B. stearothermophilus*: 10 h 333 K bzw.*6 h 333 K (Exopolysaccharide); *B. amyloliquefaciens*: 22,5 h 310 K)

Ebenso unterschieden sich die beiden Spezies in der Nutzung der angebotenen Kohlenstoffquellen: *B. stearothermophilus* wuchs besser mit Xylose oder Xylan, *B. amyloliquefaciens* besser mit Mannit oder Stärke. Dextran 40 und Cellulose MN 300 konnten von beiden Spezies nicht verwertet werden, Xylose nicht von *B. amyloliquefaciens*.
Beim Wachstum auf Monosacchariden bildete *B. stearothermophilus* aus etwa 1 % der eingesetzten Kohlenstoffquelle ein Exopolysaccharid, das mit Calcofluor® White ST gefärbt werden konnte (Abb. 4).

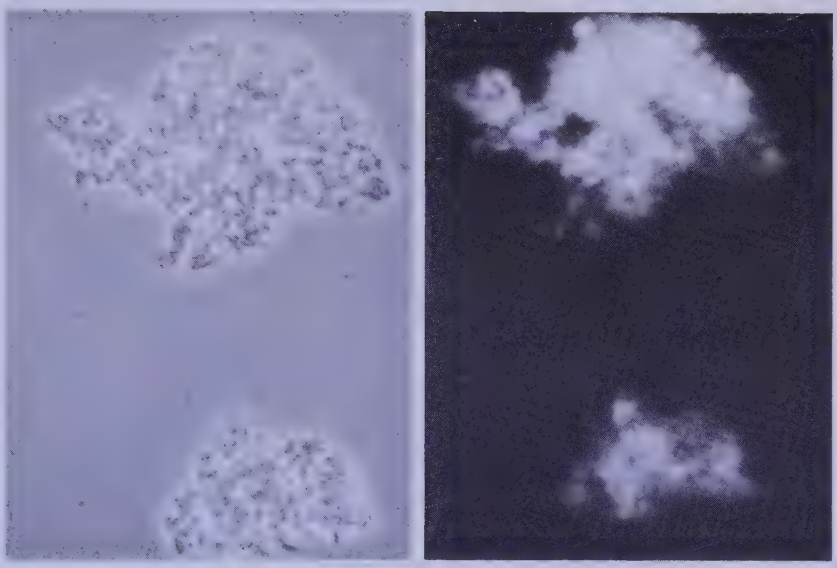


Abb. 4: Mikroskopische Aufnahmen von *B. stearothermophilus* - Sporen - nach 12 h bei 333 K auf 1 % Glukose (Vergrößerung etwa 1200 fach; links: Phasenkontrast, rechts: Fluoreszenz, Nachweis (Calcofluor® White ST) der Exopolysaccharide)

3.2.3. Abhängigkeit der Wachstumsrate von der Temperatur

Je nach der minimalen und optimalen Temperatur für die Verdoppelung werden die Bakterienarten den Psychro-, Meso- oder Thermophilen zugeordnet (Babel et al. 1972, Ljungdahl 1979, Zuber 1979).
B. stearothermophilus mit einem Minimum zwischen 310 und 318 K und einem Optimum zwischen 333 und 340 K (Abb. 5) gehört zu den thermophilen Bakterien.

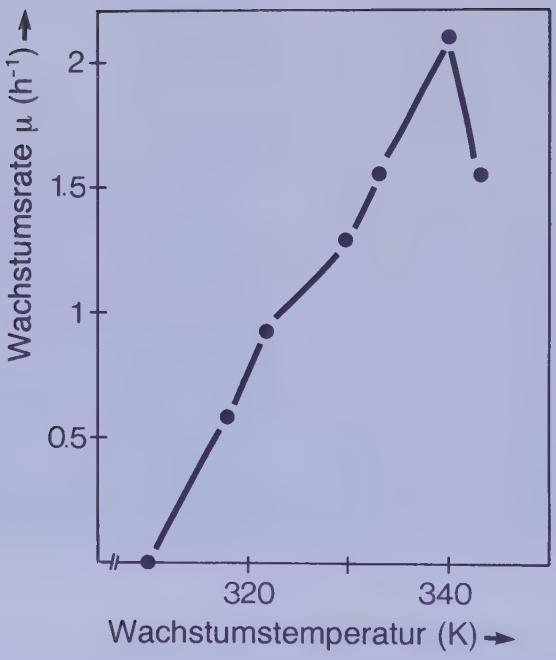


Abb. 5: Abhängigkeit der spezifischen Wachstumsrate μ von *B. stearothermophilus* von der Temperatur
(Die Wachstumsrate μ wurde während des exponentiellen Wachstums gemessen, dabei ist

$$\mu = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt}$$

N: Zellzahl/ml; t: Zeit; C-Quelle: 1 % Xylan)

Die maximale Wachstumsrate bei 340 K betrug 2,1 h^{-1}, das entspricht einer Verdoppelungszeit von 20 min; beim Wachstum auf Glukose ist die minimale Verdoppelungszeit 14 min. Hempfling (1981) erreichte in einer kontinuierlichen Kultur von *B. stearothermophilus* eine minimale Verdoppelungszeit auf Glukose von 15 min.

3.2.4. Abhängigkeit der Xylanaseproduktion von der Wachstumsphase

Nach Priest (1977) sollen Exoenzyme in der späten logarithmischen Wachstumsphase ausgeschieden werden. Bei *B. stearothermophilus* mit Xylan als Kohlenstoffquelle nahm die Xylanaseaktivität nach einer Verzögerungsphase von drei Stunden bis zwölf Stunden nach Animpfen zu, während die Zellen selbst nach fünf bis sechs Stunden in der stationären Phase waren (Abb. 6).

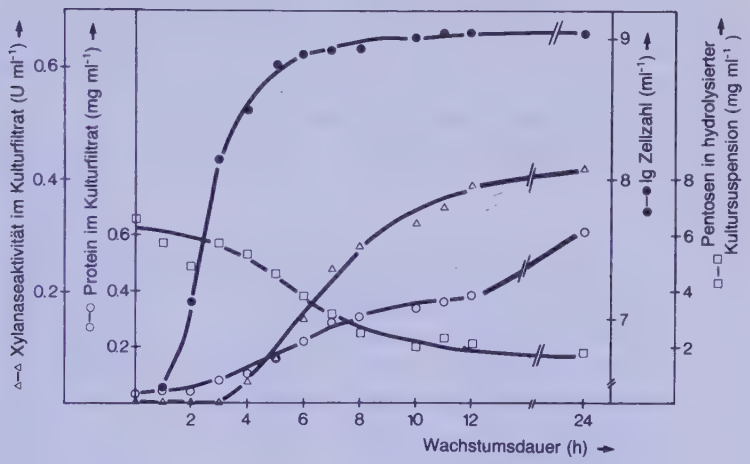


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf des Wachstums, der Xylanaseproduktion und des Xylanverbrauchs von *B. stearothermophilus* bei 333 K mit 1 % Xylan als Kohlenstoff- und Energiequelle (In die Zellzahl/ml gehen auch die Sporen ein)

Die maximale Zellzahl betrug 10^9 Zellen/ml. Diese Zahl wurde auch von Rowe et al. (1975) erreicht. Die ersten drei Stunden des Wachstums von *B. stearothermophilus* beruhten

auf einer Verwertung des Hefeextraktes (Tab. 3, Kontrolle). Mit der danach zunehmenden Xylanaseaktivität nahm der Gehalt an Xylan um 70 % ab. Ebenso wie für *B. stearothermophilus* fanden auch Sonnleitner et al. (1982) nur einen unvollständigen Verbrauch der Kohlenstoffquelle durch *Thermus thermophilus* bei 348 K, ohne dies begründen zu können.

3.2.5. Lokalisation der Xylanase

Um die Lokalisation der Xylanase zu untersuchen, wurden Zellen von *B. stearothermophilus* nach 12 Stunden Wachstum auf Xylan mit dem restlichen unlöslichen Polysaccharid abzentrifugiert und gewaschen. Durch eine Ultraschallbehandlung des resuspendierten Sediments wurde die Gesamtxylanaseaktivität, bezogen auf die Kultursuspension, erhöht (Tab. 4).

	Volumen (ml)	Xylanaseaktivität (U/ml)	(U)
Kulturfiltrat	800	0,24	192
unbeschalltes Sediment	25	0,05	1
beschalltes Sediment	25	4,34	109

Tab. 4: Lokalisation der Xylanase aus *B. stearothermophilus* (12 h bei 333 K auf 1 % Xylan; Sediment in 50 mM KH_2PO_4 pH 7, 30 sec 150 W Ultraschall)

Versuche, durch Dichtezentrifugation mit Percoll zu entscheiden, ob die Xylanase Zellwand-gebunden oder an das Xylan adsorbiert war, scheiterten, denn es wurden keine Zonen im Gradienten gebildet, die nur Zellen enthielten. Um die Bindung der Xylanase an ihr Substrat zu untersuchen, wurde gereinigtes Enzym 5 min bei 333 K mit 2 % Xylan in-

kubiert. Das unlösliche Polysaccharid wurde abzentrifugiert und die Xylanaseaktivität im Überstand bestimmt. Nur noch 50 % der Aktivität konnten nachgewiesen werden, der Rest war an das unlösliche Xylan gebunden.

3.2.6. Aktivitätsspektrum des Kulturfiltrats

Um zu untersuchen, wieviele verschiedene Proteine *B. stearothermophilus* beim Wachstum auf Xylan ausschied, wurde das Kulturfiltrat nach 12 Stunden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant Blue angefärbt. Das Proteinspektrum umfaßte mehr als 15 Banden, von denen eine der Xylanase zugeordnet werden konnte (Abb. 7).

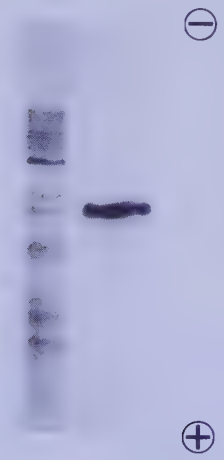


Abb. 7: Gelelektrophoretische Auftrennung und anschließende Proteinfärbung des Kulturfiltrats von *B. stearothermophilus* nach 12 h bei 333 K auf 1 % Xylan (rechts eine angereicherte Xylanase zur Markierung)

Um den Banden eventuelle Enzymaktivitäten zuordnen zu können, wurde das Kulturfiltrat mit verschiedenen Substraten auf Glukosidase-, Amylase-, Cellulase-, Protease-, Xylanase- und Xylosidaseaktivität geprüft. Es wurde jedoch neben Xylan nur noch das Xylobiose-Analogon p-Nitrophenyl-ß-D-xylopyranosid (PNXP) hydrolysiert (Tab. 5).

Substrat	Enzymaktivität (mU/ml)
Cellobiose	0
Stärke	0
Carboxymethyl-cellulose	0
Azocasein	0
Xylan	200
PNXP	5

Tab. 5: Enzymaktivitäten des Kulturfiltrats nach 12 h Wachstum bei 333 K (Stärke, Carboxymethylcellulose, Azocasein und Xylan: 1 %; Cellobiose: 1 mM; PNXP: 13 mM)

Um zu untersuchen, welche xylanolytischen Aktivitäten vorhanden waren, wurde das Kulturfiltrat mit Haferspelzenxylan

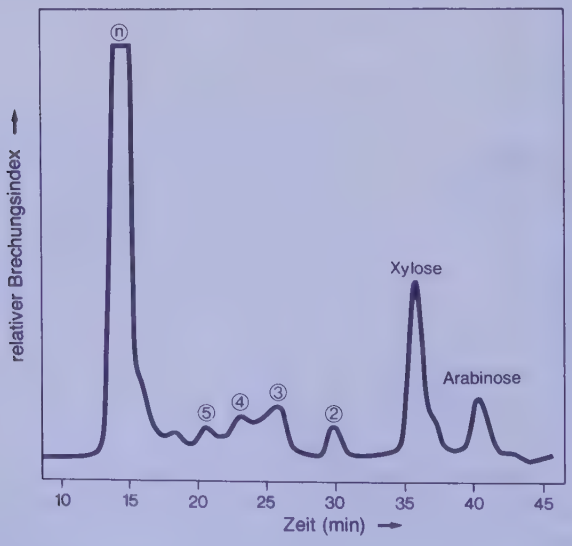


Abb. 8: Spektrum der Abbauprodukte, HPLC-Analyse von Haferspelzenxylan nach Inkubation mit Kulturfiltrat (②③...: Polymerisationsgrad der Xylooligomere; ⓝ: Xylan; 2 U/ml, 4 h, 333 K, pH 7, 2 % Xylan)

inkubiert und anschließend das Produktspektrum mit HPLC analysiert (Abb. 8). Die großen Anteile von Xylose und Arabinose zeigten, daß im Kulturfiltrat von *B. stearothermophilus* mindestens zwei xylanolytische Enzyme vorhanden waren: eine Xylanase, die das Xylan in Oligomere und eventuell Arabinose spaltet, und eine Xylosidase, die kurzkettige Oligomere zu Xylose hydrolysiert.

3.3. Reinigung der Xylanase von *B. stearothermophilus*

Wegen der sehr geringen Aktivität im Kulturfiltrat (0,2 U/ml) mußte der erste Schritt zur Reinigung der Xylanase eine Konzentrierung sein.
Viele Autoren, u. a. Horikoshi und Atsukawa (1973), Gorbacheva und Rodionova (1977), John et al. (1979), und eigene Vorversuche zeigten, daß Xylanasen an Hydroxylapatit gebunden werden. Bei der Reinigung der Xylanase von *B. stearothermophilus* erfolgte die Adsorption im batch, denn so konnte der Xylanase-freie Überstand dekantiert werden. Er enthielt die Hälfte der gesamten Proteinmenge. Anschließend wurde das beladene Hydroxylapatit in eine Chromatographie-Säule gefüllt. Durch die gleichmäßige Verteilung des adsorbierten Proteins über die gesamte Säule erfolgte die Elution mit einem linearen Kalium-Phosphat-Gradienten in einem einzigen Proteinpeak (Abb. 9). Die Xylanase konnte in Fraktionen mit etwa 0,23 M KH_2PO_4 nachgewiesen werden.
Bei diesem Verfahren wurde nur ein Teil (< 10 %) der PNXPaseaktivität an Hydroxylapatit gebunden und mit der Xylanase eluiert.

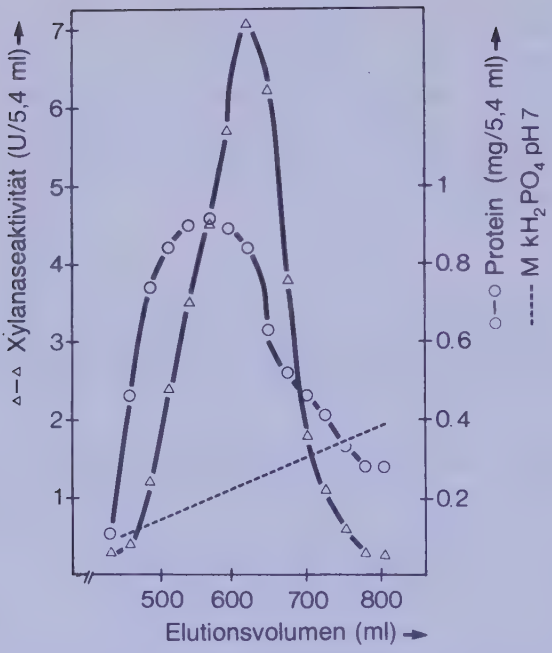


Abb. 9: Elution der Xylanase von Hydroxylapatit bei 277 K mit einem linearen Kalium-Phosphat-Gradienten von 0,1 bis 0,5 M pH 7

Die so konzentrierte (Faktor 7) und gleichzeitig vorgereinigte Xylanase wurde über einen Ionenaustauscher weiter gereinigt. Dazu wurden die Fraktionen von der Hydroxylapatit-Säule mit einer Anreicherung > 5 vereinigt, umgepuffert und auf eine äquilibrierte DEAE-Sephadex A 50-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit einem linearen Tris/HCl Gradienten pH 8 von 0,1 bis 0,5 M (Abb. 10).

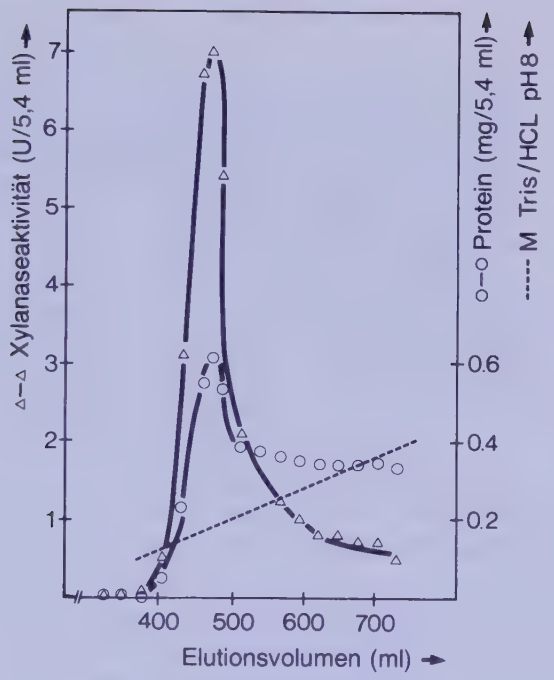


Abb. 10: Elution der Xylanase von DEAE-Sephadex A 50 bei 277 K mit einem linearen Tris/HCl-Gradienten pH 8 von 0,1 bis 0,5 M

Die Xylanase-enthaltenden Fraktionen wurden durch Ultrafiltration konzentriert und auf ihre gelelektrophoretische Reinheit überprüft (Abb. 11). Es zeigte sich, daß die Xylanase von *B. stearothermophilus* nach der Reinigung an DEAE-Sephadex A 50 nicht durch andere Proteine verunreinigt war.

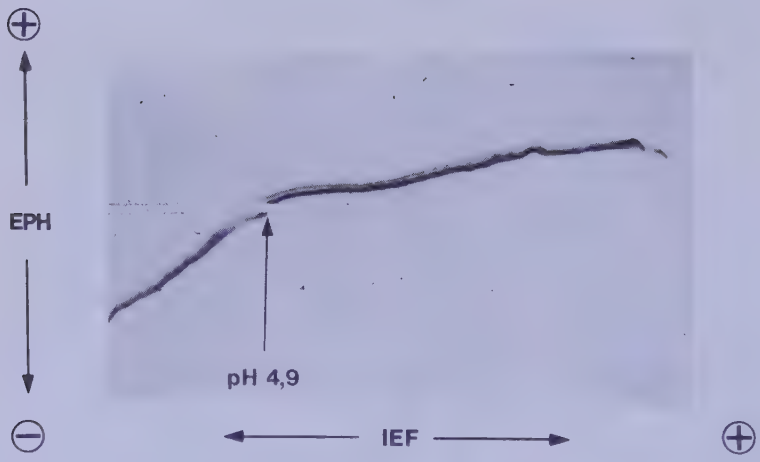


Abb. 11: Titrationskurve der gereinigten Xylanase (1. Dimension: IEF von pH 2 bis 11; 2. Dimension: EPH)

Durch das beschriebene Reinigungsverfahren gelang es, die Xylanase von *B. stearothermophilus* mit einer Ausbeute von etwa 50 % über 40 fach anzureichern (Tab. 6).

	Volumen (ml)	Xylanase-aktivität (U)	Protein-gehalt (mg)	spezifische Aktivität (U/mg)	Anreicherung	Ausbeute (%)
Kultur-filtrat	1430	280	617	0,45	1	100
Hydroxyl-apatit	150	209	21	9,95	22	75
Ionenaus-tauscher	78	149	8	18,60	41	53

Tab. 6: Anreicherungstabelle für die Reinigung der Xylanase aus *B. stearothermophilus*

3.4. Untersuchungen zum Kohlenhydratanteil der Xylanase von *B. stearothermophilus*

Viele extrazelluläre Polysaccharasen enthalten nach der Abtrennung von Fremdproteinen noch Zucker (Frederick et al. 1981, Nagasaki et al. 1981, Zalewska-Sobczak und Urbanek 1981, Sanchez et al. 1982, Bernier et al. 1983, Creuzet und Frixon 1983), jedoch wurde nur in wenigen Fällen geprüft, ob es sich um ein Glykoprotein handelte. Sanchez et al. (1982) zeigten, daß der Kohlenhydratanteil einer Exoglukanase von *Saccharomyces cerevisiae* mit der Endo-β-N-acetylglukosaminidase abgetrennt werden konnte. Beim Wachstum der Hefe in Anwesenheit von Tunicamycin, einem Transglykosylierungshemmstoff, war außerdem das Molekulargewicht geringer und es erfolgte keine Bindung mehr an das Lektin Concanavalin A.
Um zu untersuchen, ob die Xylanase aus *B. stearothermophilus* ein Glykoprotein ist, wurde zunächst geprüft, ob sie einen Zuckeranteil hatte. Nach einer Trennung im Polyacrylamidgel wurde die Xylanasebande nicht nur mit Coomassie-Brilliant Blue sondern auch durch Schiffsches Reagenz nach Zacharius et al. (1969) angefärbt (Abb. 12).
Aus der Anfärbung der Proteinbande mit Schiffschem Reagenz folgt, daß ein Kohlenhydratanteil vorhanden war, der durch Hydroxylapatit, Ionenaustauscher und Gelelektrophorese nicht abzulösen war.

Abb. 12: Gelelektrophorese der Xylanase von *B. stearothermophilus* mit anschließender Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue (A) bzw. Zuckerfärbung mit Schiffschem Reagenz (B)

Durch weitere Experimente sollte die Zusammensetzung des Zuckeranteils untersucht werden. Versuche mit mehreren Agarose-fixierten Lektinen deuteten darauf hin, daß Fukose vorhanden war. Eine Zuckeranalyse der Hydrolyseprodukte der Xylanase ergab einen Gesamtkohlenhydratanteil von 63 %, der sich zusammensetzte aus 46 % Xylose, 30 % Fukose oder Arabinose und 24 % Galaktose (Tab. 8).
Im Zuckeranalysator waren die Retentionszeiten für Arabinose und Fukose gleich. Es konnte daher nicht unterschieden werden, um welchen der beiden Zucker es sich im Hydrolysat handelte. Erst durch eine dünnschichtchromatographische Auftrennung des Enzymhydrolysats wurde Arabinose als dritter

Bestandteil des Kohlenhydratanteils identifiziert (Tab. 7).

Zucker	R_f-Werte		
	Einzel-referenzen	Referenz-gemisch	Hydrolysat
Galaktose	0,39	0,38	0,37
Xylose	0,48	0,49	0,48
Arabinose	0,41	0,42	0,41
Fukose	0,46	0,46	

Tab. 7: Identifizierung der Zuckerbestandteile des Proteinhydrolysats mittels Dünnschichtchromatographie

Damit ergab sich eine für Glykoproteine ungewöhnliche Zusammensetzung, denn bisher wurde in ihnen keine Arabinose und nur in geringen Mengen Xylose nachgewiesen (Kornfeld und Kornfeld 1976, Berger et al. 1982). Die Zucker, die im Kohlenhydratanteil der Xylanase gefunden wurden, sind jedoch Bestandteile des Haferspelzenxylans (Abb. 13).

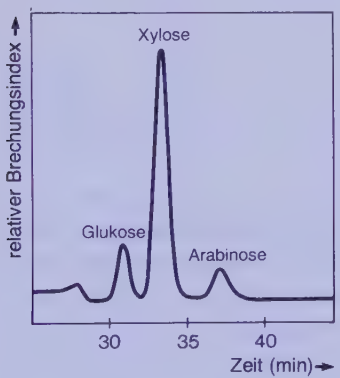


Abb. 13: Zuckerbestandteile des Haferspelzenxylans, bestimmt nach saurer Hydrolyse (HPLC) (61 % Xylose, 10 % Glukose, 5 % Arabinose)

Nach John et al. (1979) ist Glukose auf Verunreinigungen des Xylans durch Cellulose oder andere Glukane zurückzuführen. Bei einer Trennung der Hydrolyseprodukte des Xylans durch den Zuckeranalysator wurde etwa 1 % der Zucker als Galaktose nachgewiesen. Sie wurde in der HPLC durch Xylose

verdeckt, weil ihre Retentionszeiten dort gleich sind.

Der Zuckeranteil einer Xylanasepräparation aus *Trichosporon cutaneum* konnte durch Dialyse entfernt werden, nachdem das Protein durch eine SDS-Behandlung denaturiert worden war (Stüttgen 1981). Dies gelang nicht bei der Präparation aus *B. stearothermophilus* (Tab. 8), auch nicht durch zusätzliches Dithiothreitol zur Reduktion von Disulfidbrücken (Cleland 1964) oder Harnstoff.

Vorbehandlung vor Hydrolyse	Gewichtsanteil des gesamten Kohlenhydrats an der Enzympräparation	Molarer Anteil der Monosaccharide am gesamten Kohlenhydrat		
	(%)	(%)		
		Xylose	Arabinose	Galaktose
keine	63	46	30	24
5'373 K in 1 % SDS Dialyse	57	49	30	21
5'373 K in 1 % SDS + 90 mm Dithiothreitol Dialyse	54	51	30	19
6 m Harnstoff Dialyse	66	48	32	20

Tab. 8: Zusammensetzung des Zuckeranteils der Xylanase von *B. stearothermophilus*
(1 ml vorbehandelte Probe wurde mit 0,3 ml 8 M HCl 1 h bei 373 K hydrolysiert, mit 247 mg $NaHCO_3$ neutralisiert und mit dem Zuckeranalysator 1 analysiert)

Paice et al. (1978) konnten durch eine SDS-Gelelektrophorese die Xylanase aus *Schizophyllum commune* von anhaftenden Zuckern trennen. Auch die Xylanase aus *B. stearothermophilus* war nach einer SDS-Gelelektrophorese nicht mehr mit Schiffschem Reagenz zu färben (Abb. 14).

a b c d

Abb. 14: SDS-Gelelektrophorese der Xylanase von *B. stearothermophilus* (b, c) und saurem α_1-Glykoprotein (Mensch) (a, d) mit nachfolgender Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue (rechts) bzw. Zuckerfärbung mit Schiffschem Reagenz (links)

Die Abtrennung des Zuckeranteils nach SDS-Behandlung durch Gelelektrophorese bewies, daß er nicht kovalent an das Protein gebunden war, d. h. die Xylanase aus *B. stearothermophilus* ist kein Glykoprotein.
Zalewska-Sobczak und Urbanek (1981) versuchten, mit einer Cellulase-Hemicellulase-Präparation den Kohlenhydratanteil der Xylanase von *Fusarium avenaceum* enzymatisch abzutrennen. Zu dem geringen Zuckerabbau (von 17 auf 8 %) kam als weiterer Nachteil die Verunreinigung durch das zugesetzte Enzymgemisch.
Für die Abtrennung des Zuckeranteils der Xylanase aus *B. stearothermophilus* wurde nach einer wirkungsvolleren Methode gesucht. Vorversuche mit dem Kulturfiltrat zeigten, daß die Xylanase sehr temperaturstabil war. Diese Eigenschaft sollte ausgenutzt werden, denn die Abnahme der Bindungsenergie zwischen den nicht kovalent gebundenen Komponenten und dem

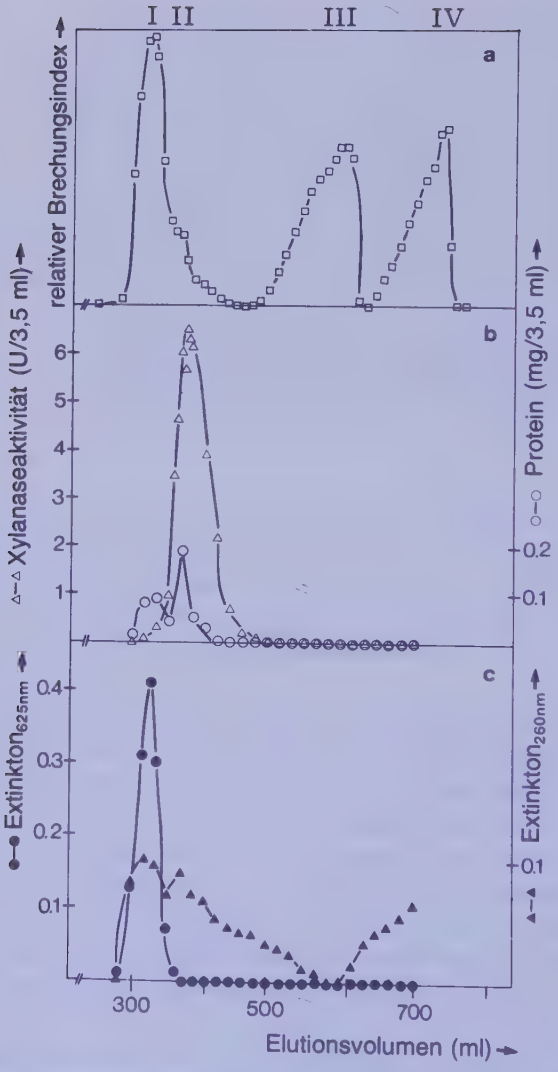


Abb. 15: a) Elutionsdiagramm der Enzymnachreinigung über Fractogel bei einer Säulentemperatur von 333 K
b) Protein- und Xylanaseaktivitätsverteilung im Eluat
c) Kohlenhydratverteilung im Eluat (Anthron-Test) und Extinktion bei 260 nm

Enzym mit zunehmender Temperatur ließ erwarten, daß sie bei genügend hoher Temperatur und unterschiedlichen Molekulargewichten durch eine Gelfiltration voneinander zu trennen wären. Deshalb wurden 4,8 ml Enzymlösung mit 13 mg Protein und 136 U auf eine Fractogel-Säule mit einer Säulentemperatur von 333 K aufgetragen. Es konnten vier Fraktionen eluiert werden (Abb. 15 a). 77 % der Xylanaseaktivität konnten in Fraktion II (Abb. 15 b) wiedergefunden werden. Fraktion I bestand hauptsächlich aus Kohlenhydrat, Fraktionen III und IV vermutlich aus Lipid bzw. Nukleinsäure (Abb. 15 c). Da die Zucker vor der Xylanase eluiert wurden, kann angenommen werden, daß ihr Molekulargewicht größer als das des Proteins ist. Die Größe des Kohlenhydrats könnte erklären, warum die Abtrennung durch SDS-Behandlung und Dialyse nicht gelang. Die Zucker könnten zwar frei geworden sein, waren aber für die Poren des Dialyseschlauchs zu groß.

Abb. 16: Gelelektrophorese der Xylanase aus *B. stearothermophilus* (b, c) und saurem α_1-Glykoprotein (Mensch) (a, d) mit nachfolgender Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant Blue (links) bzw. Zuckerfärbung mit Schiffschem Reagenz (rechts)

Um zu überprüfen, ob die Xylanase nach dieser Chromatographie frei von Zuckern war, wurde sie gelelektrophoretisch analysiert. Erwartungsgemäß wurde die Proteinbande durch Schiffsches Reagenz nicht mehr angefärbt (Abb. 16). Mit dieser von Fremdprotein und Kohlenhydrat gereinigten Xylanase wurden die nachfolgenden Charakterisierungsexperimente unternommen.

3.5. Charakterisierung der Xylanase von *B. stearothermophilus*

3.5.1. Molekulargewicht

Das Molekulargewicht der Xylanase von *B. stearothermophilus* wurde sowohl durch Gelfiltration über Bio Gel P 200 als auch durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Die Gelfiltration ergab ein Molekulargewicht von 67000 Dalton (Abb. 17), die SDS-Gelelektrophorese eins von 49000 Dalton (Abb. 18).

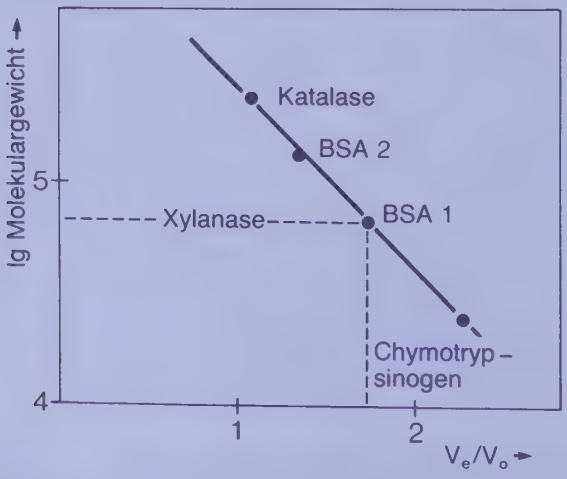


Abb. 17: Molekulargewichtsbestimmung der Xylanase über Bio Gel P 200 (v_e/v_o: Elutionsvolumen/Ausschußvolumen)

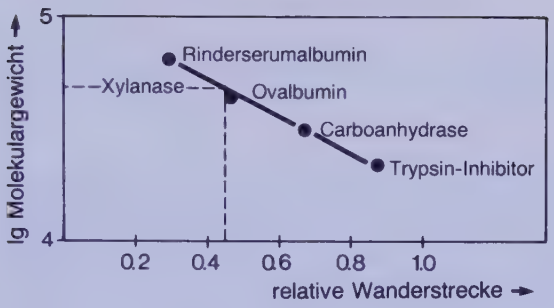


Abb. 18: Molekulargewichtsbestimmung der Xylanase von *B. stearothermophilus* über SDS-Gelelektrophorese

Eine Erhöhung der SDS-Konzentration von 1 auf 2 bzw. 3 % hatte keinen Einfluß auf die Mobilität des Proteins.

3.5.2. Aminosäurezusammensetzung

Die Xylanase aus *B. stearothermophilus* hat einen sehr großen Anteil an unpolaren und sauren Aminosäuren (Tab. 9). Sie unterscheidet sich dadurch deutlich von den Xylanasen aus den mesophilen *B. pumilus* (Panbangred et al. 1983) und *B. subtilis* (Bernier et al. 1983), die mehr polare und weniger saure Aminosäuren haben. Cystein fehlt ebenso wie in der Xylanase von *Sporotrichum thermophile* (Margaritis et al. 1983) und der α-Amylase von *B. stearothermophilus* (Pfueller und Elliott 1969). Auch bei diesem Enzym waren die unpolaren Aminosäuren stärker als bei den anderen vertreten.

Aminosäure	Aminosäurezusammensetzung (mol %)				
	B. stearo-thermophilus	*S. thermophile*	*B. pumilus*	*B. subtilis*	*B. stearo-thermophilus* Amylase
Asx	12,81	10,60	11,35	10,73	13,41
Glx	12,46	9,19	7,03	6,23	7,69
Glycin	8,83	12,33	11,35	18,69	10,33
Lysin	7,95	2,47	4,32	4,84	6,15
Alanin	7,51	9,69	7,03	7,61	7,69
Valin	6,71	6,73	3,78	4,84	6,37
Isoleucin	6,71	2,37	4,32	3,11	3,30
Prolin	6,01	4,62	3,78	5,88	3,52
Leucin	5,83	4,75	4,32	3,46	6,81
Threonin	5,83	13,49	8,65	9,00	8,13
Serin	4,86	14,74	9,19	12,11	6,59
Phenylalanin	3,80	1,65	3,78	1,04	4,62
Tyrosin	3,62	3,67	4,86	4,50	5,49
Arginin	3,27	2,22	3,78	3,46	3,52
Histidin	3,27	1,15	2,16	2,08	1,98
Methionin	0,53	0,34	2,16	1,04	1,76
Cystein	0	0	0,54	1,38	0
Tryptophan	n. b.	n.b.	7,57	n. b.	n. b.
unpolar	37,10	30,15	29,17	26,98	34,07
polar	23,14	44,23	34,59	57,79	30,54
sauer	25,27	19,79	18,38	16,96	21,10
basisch	14,49	3,96	10,26	10,38	11,65

Tab. 9: Aminosäurezusammensetzung der isolierten Xylanase aus *B. stearothermophilus*. Zum Vergleich dazu der Literatur entnommene Werte für Xylanasen aus einem thermophilen Pilz und aus mesophilen Bakterien, sowie für die Amylase von *B. stearothermophilus*
(Asx: Summe von Asparagin und Asparaginsäure; Glx: Summe von Glutamin und Glutaminsäure; n. b.: nicht bestimmt; Zitate siehe Text)

3.5.3. Isoelektrischer Punkt

Der isoelektrische Punkt (I. E. P.) der Xylanase liegt bei pH 4,9 ± 0,1 (Abb. 19), was die große Zahl der sauren Aminosäuren widerspiegelt.

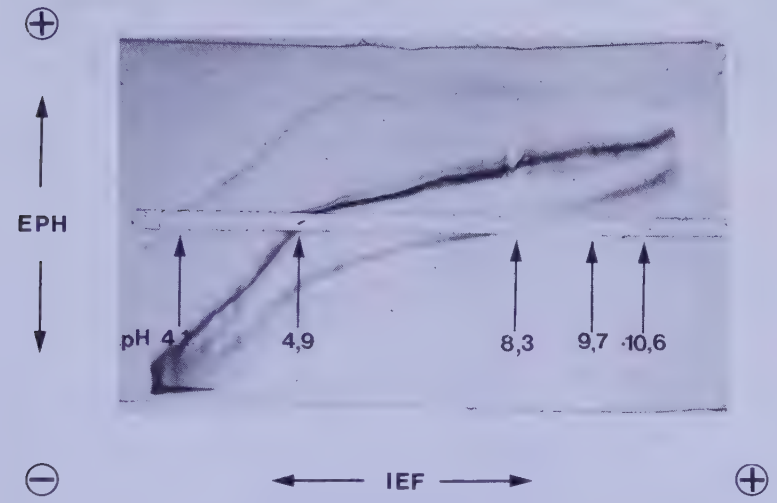


Abb. 19: Titrationskurve der Xylanase mit Referenzproteinen zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts (1. Dimension: IEF von pH 2 bis 11; 2. Dimension: EPH; Referenzproteine: pH 10,6: Cytochrom c, pH 4,1, 4,9, 8,3 und 9,7: acetylierte Cytochrome c (alle aus Pferdeherz)

Der I. E. P. der Xylanase von *B. stearothermophilus* ähnelt denen der meisten anderen daraufhin untersuchten Xylanasen (Gorbacheva und Rodionova 1977, Horikoshi und Atsukawa 1973, Frederick et al. 1981). Nur sehr wenige dieser Enzyme haben basische I. E. P., wie die Xylanase aus *Trichoderma pseudokoningii* mit 9,6 (Baker et al. 1977) oder die aus *B. coagulans* mit 10 (Esteban et al. 1983).

3.5.4. pH-Optimum und pH-Stabilität

Um das pH-Optimum der Xylanase zu bestimmen, wurden Aktivitätstests mit verschiedenen Puffern und pH-Werten durchgeführt. Die Xylanase aus *B. stearothermophilus* war aktiv zwischen pH 5 und 11 (Abb. 20), in einem auffallend weiten pH-Bereich von pH 6 bis 9 mit optimaler Aktivität. In diesem pH-Bereich war sie wenigstens zwei Stunden zu 100 % stabil.

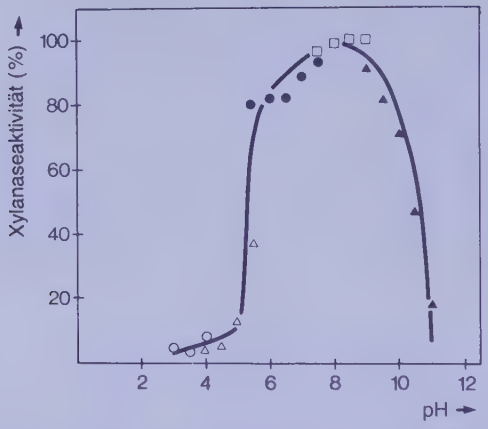


Abb. 20: pH-Optimum der Xylanase bei 333 K
(○—○: Na-Formiat-Ameisensäure; △—△: Na-Acetat-Essigsäure; ●—●: K_2HPO_4-KH_2PO_4; □—□: Tris/HCl; ▲—▲: Trimethylamin-NH_4^+; alle 50 mM)

In einem ähnlich breiten pH-Bereich waren auch die Xylanase eines alkalophilen *Bacillus* von Horikoshi und Atsukawa (1973) und die Glukanase eines von Borriss (1981) isolierten *Bacillus* aktiv. Die meisten der aus Bakterien und auch Pilzen isolierten Xylanasen zeigen sehr enge pH-Optima (z. B. John et al. 1979, Uchino und Nakane 1981, Conrad 1981, Bernier et al. 1983).

3.5.5. Temperaturoptimum und -stabilität

Um die optimale Temperatur für die Aktivität der Xylanase aus *B. stearothermophilus* zu untersuchen, wurde der Aktivitätstest mit dem gereinigten Enzym bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Ab 303 K nahm die Aktivität stetig bis zum Maximalwert 338 K zu (Abb. 21) und fiel danach rasch ab.

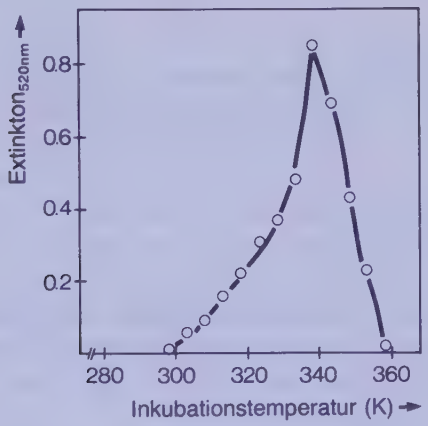


Abb. 21: Abhängigkeit der Xylanaseaktivität bei pH 7 von der Inkubationstemperatur

Bei 358 K konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. Damit ist die Temperatur für ein optimales Wachstum von *B. stearothermophilus* auch die beste für die Xylanaseaktivität.
Die Temperaturstabilität der Xylanase aus *B. stearothermophilus* wurde ohne Substrat untersucht. Da das Elutionsmittel des letzten Reinigungsschrittes (Gelfiltration 333 K) Wasser war, war die Enzymlösung ungepuffert. Nach zwei Stunden bei 338 K wurde noch kein Aktivitätsverlust festgestellt, und auch bei 343 K war noch mehr als 50 % der Xylanase aktiv (Abb. 22).

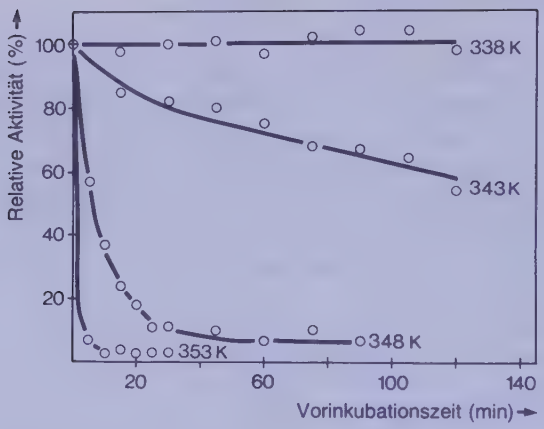


Abb. 22: Temperaturstabilität der Xylanase von *B. stearothermophilus*, vorinkubiert in Wasser

Zum Vergleich wurde die Temperaturstabilität der Xylanase von *B. amyloliquefaciens* (Kulturfiltrat) bei 333 K bestimmt. Nach einer Vorinkubationszeit von zwei Stunden war keine Aktivität mehr nachweisbar.

3.5.6. Einfluß von Ca^{++}-Ionen und eines SH-Reagenzes

Von vielen Autoren, u. a. Pfueller und Elliott (1969), Ogasahara et al. (1970), Horikoshi und Atsukawa (1973), Yutani (1976) und Borriss (1981), wurden Ca^{++}-Ionen als Effektoren für die Temperaturstabilität von extrazellulären Enzymen beschrieben.
Es wurde deshalb untersucht, ob Ca^{++} die Aktivität der Xylanase aus *B. stearothermophilus* steigerte, bzw. ob Ethylendiamintetraacetat (EDTA), ein Komplexbildner, die Aktivität minderte. Dazu wurden Xylanasetests in Anwesenheit von Ca^{++} bzw. EDTA durchgeführt. Die Aktivität wurde jedoch weder durch EDTA noch durch Ca^{++} beeinträchtigt (Tab. 10).

Zusatz	Restaktivität (%)	
	1 mM*	5 mM*
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	97	94
EDTA	113	108
PCMB	61	0
NaN_3	93	98

Tab. 10: Einfluß von Ca^{++}-Ionen, EDTA, PCMB und NaN_3 auf die Xylanaseaktivität von *B. stearothermophilus* (*: Konzentration des Zusatzes)

Das SH-Reagenz 4-Chlormerkuribenzoesäure (PCMB) hemmte die Xylanaseaktivität bei einer Konzentration von 5 mM völlig (Tab. 10).
NaN_3 hatte keinen Einfluß und konnte somit bei der Aufbewahrung des Enzyms als Mittel gegen Infektionen durch Mikroorganismen eingesetzt werden.

3.6. Untersuchungen zum enzymatischen Abbau von Xylan und Xylooligomeren

3.6.1. Abbau von Xylan

Um die Endprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Xylan zu untersuchen, wurde das Polysaccharid vier Stunden mit der Xylanase bei 333 K inkubiert. Eine Zuckeranalyse mit HPLC zeigte, daß Oligosaccharide und Xylose entstanden waren (Abb. 23). Arabinose als mögliches Abbauprodukt war nicht nachweisbar, d. h. daß die Xylanase Arabinose nicht abspalten kann.
Da die Oligosaccharide bei der Analyse entsprechend ihrer Polymerisationsgrade aufgetrennt wurden, konnte mit dieser Methode nicht zwischen z. B. A_2X und X_3 unterschieden werden.

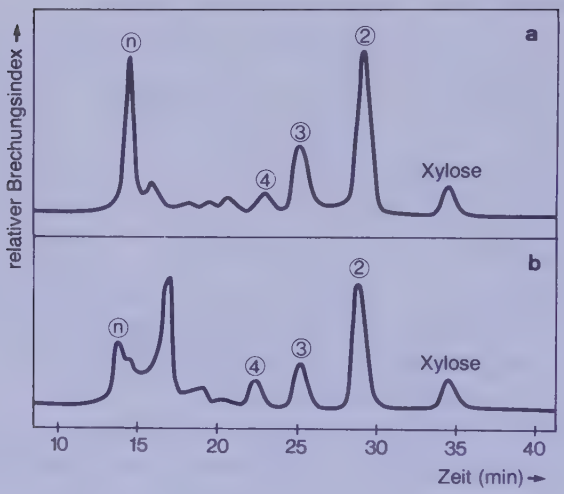


Abb. 23: Spektren der Abbauprodukte, HPLC-Analyse von a) Haferspelzen- b) Birkenxylan nach Inkubation mit gereinigter Xylanase von *B. stearothermophilus* (②,③...: Polymerisationsgrad der Xylooligomere; ⓝ: Xylan; 4 U/ml, 4 h 333 K, pH 7, 1 % Xylan)

Zum Vergleich der Abbaubarkeit von verschiedenen Xylanen wurde die Xylanase von *B. stearothermophilus* zusätzlich zum bisher verwendeten Haferspelzenxylan mit Birkenxylan inkubiert. Die unterschiedlichen Mengen der einzelnen Produkte (Abb. 23 a und b) zeigten an, daß die Xylanase das Grasxylan weiter abbauen konnte als das Holzxylan. Der zusätzliche Peak in b mit der Retentionszeit 17 min ist auf Verunreinigungen des Birkenxylans zurückzuführen, denn er erscheint auch in einem Chromatogramm von Birkenxylan ohne Enzym.

In einem Versuch zur Kinetik des Xylanabbaus konnte gezeigt werden, daß die Hydrolyse nach vier Stunden beendet war (Abb. 24). Da die Seitenketten nicht abgespalten werden konnten, war das Xylan nicht vollständig abgebaut worden.

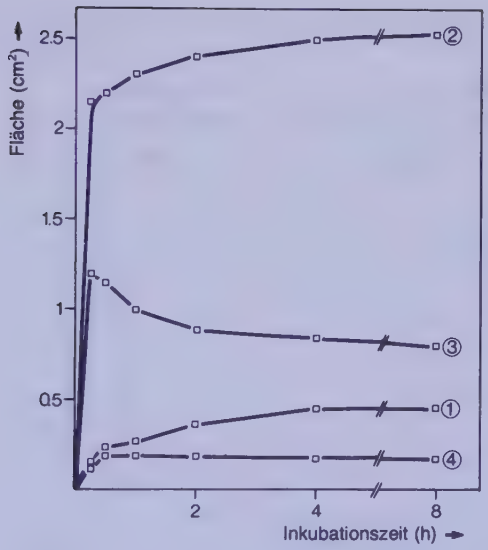


Abb. 24: Bildung von Oligosacchariden bei der enzymatischen Hydrolyse von Xylan (HPLC-Analyse) ①,②...: Polymerisationsgrad der Xylooligomere; 4 U/ml, 333 K, pH 7, 1 % Xylan)

Während die Konzentration der Mono- und Dimeren im Lauf der Zeit zunahm, durchlief die Konzentration des Trimeren bei 15 min ihren Maximalwert.

3.6.2. Abbau von Xylooligomeren

Biely et al. (1980) und Panbangred et al. (1983) beobachteten Transglykosylierungsreaktionen beim Xylanabbau durch *Cryptococcus albidus* bzw. *B. pumilus*.
Um zu überprüfen, ob auch die Xylanase aus *B. stearothermophilus* Zucker transferieren kann, wurde der Abbau von definierten Xylooligosacchariden (Polymerisationsgrad 2 bis 6) untersucht. Auch nach vier Stunden bei 333 K war Xylobiose nicht abgebaut. Aus den übrigen Oligomeren waren Xylobiose

und Xylose entstanden (Tab. 11).

	Substrat-konzentration (nmol/ml)	Endprodukt-konzentration (nmol/ml)	
		X_2	X
X_2	35	33	0
X_3	24	28	10
X_4	18	29	10
X_5	15	30	10
X_6	12	28	9

Tab. 11: Endprodukte der enzymatischen Hydrolyse von Xylooligomeren (HPLC-Analyse) (1,7 U/ml, 4 h, 333 K)

(Obwohl die Xylanase Xylobiose nicht spalten kann, hydrolysierte sie PNXP mit 1 % der Aktivität gegen Xylan). Das bei allen Abbaureaktionen (mit Ausnahme von X_2) entstandene Verhältnis von Xylobiose zu Xylose wie drei zu eins ließ auf Transferreaktionen schließen, denn wenn Xylobiose nicht gespalten wird, sollten bei einer Hydrolyse von z. B. Xylotriose Xylobiose und Xylose zu gleichen Teilen entstehen. Das im Versuch erzielte Ergebnis ließ vermuten, daß z. B. die gebildete Xylose sofort auf eine Xylotriose übertragen und die so entstandene Xylotetraose in zwei Xylobiosemoleküle gespalten wurde. Die Xylanase aus *B. stearothermophilus* hätte somit nicht nur hydrolytische sondern auch transferierende Eigenschaften.
Um Transglykosylierungen durch die Xylanase von *B. stearothermophilus* direkt nachzuweisen, wurde das Enzym nur kurze Zeit (10 min) mit X_5 inkubiert. Die nachfolgende Auftrennung der entstandenen Produkte über einen Zuckeranalysator (Abb. 25) zeigte, daß nicht nur X_4, X_3 und X_2 son-

dern auch X_6 und X_7 gebildet worden waren. Xylose konnte nicht nachgewiesen werden.

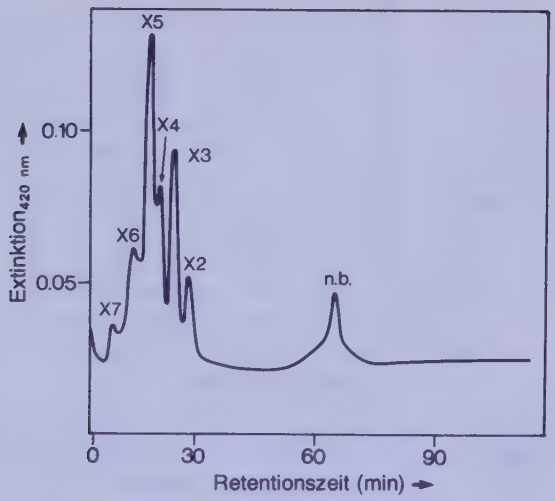


Abb. 25: Hydrolyse- und Transglykosylierungsprodukte einer Inkubation von X_5 mit der Xylanase aus *B. stearothermophilus* (Biotronik-Zuckeranalysator) (0,1 U/ml, 5 mM X_5, pH 7, 10 min, 333 K) (n. b.: nicht bestimmt)

Da bei der Hydrolyse von X_5 mehr X_3 und X_2, weniger X_4 und keine Xylose gebildet wurden, kann angenommen werden, daß X_3 und X_2 bevorzugt abgespalten werden. Xylose konnte nicht nachgewiesen werden, weil sie wahrscheinlich sofort nach der Hydrolyse als Substrat in einer Transglykosylierungsreaktion diente.
In einem parallelen Versuch mit X_3 als Substrat wurden auch Transglykosylierungsprodukte gemessen (Abb. 26). Die Reaktionsgeschwindigkeit war jedoch ungleich geringer als mit X_5, was einen Hinweis gibt auf die Abhängigkeit der Xylanaseaktivität von der Kettenlänge des Substrats.

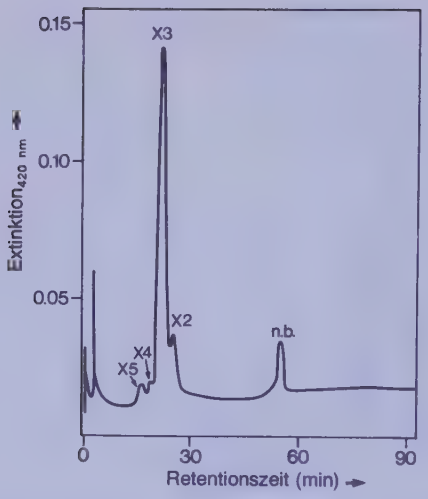


Abb. 26: Hydrolyse- und Transglykosylierungsprodukte einer Inkubation von X_3 mit der Xylanase aus *B. stearothermophilus* (Biotronik-Zuckeranalysator) (0,1 U/ml, 5 mM X_3, pH 7, 10 min, 333 K) (n. b.: nicht bestimmt)

4. Diskussion

Die Xylanasesynthese kann sowohl induktiv als auch konstitutiv erfolgen. Eriksson und Pettersson (1971) wiesen eine Xylanase beim Wachstum von *Stereum sanguinolentum* auf Cellulose nach. Sandhu und Kalra (1982) beschrieben die Produktion von Xylanasen durch *Trichoderma longibrachiatum* auch mit Pektin und Cellulose. Park und Toma (1974) und Nakanishi et al. (1976) fanden eine Xylanase aus Streptomyceten nur mit Xylan. Nach Esteban et al. (1983) synthetisiert *Bacillus* nur dann eine extrazelluläre Polysaccharase, wenn das entsprechende Substrat vorhanden ist.
Der in dieser Arbeit isolierte *B. stearothermophilus* schied nur beim Wachstum auf Xylan eine Xylanase aus. Mit dieser Kohlenstoffquelle bildete er keine Amylase. Grundsätzlich muß er jedoch dieses Enzym synthetisieren können, denn er konnte auf Stärke wachsen. Es kann vermutet werden, daß *B. stearothermophilus* Enzyme zum extrazellulären Polysaccharidabbau nicht konstitutiv bildet, sondern daß es erst einer Induktion bedarf.
Bei *Streptomyces* spec. konnte die Xylanase durch β-D-Xyloside induziert werden (Nakanishi und Yasui 1980), bei *Cryptococcus albidus* durch Xylobiose, die daneben auch die Bildung einer β-Xylosid-Permease als aktivem Transportsystem bewirkte (Kratky und Biely 1980).

Neben der Xylanase sind am vollständigen Xylanabbau noch andere Enzyme beteiligt (Puls et al. 1978). Wie bei *Diplodia viticola* (Strobel 1963) sind die Produktspektren der Xylanhydrolyse durch Kulturfiltrat bzw. Xylanase von *B. stearothermophilus* unterschiedlich: Zusätzlich zur Xylanase scheidet das Bakterium vermutlich eine Xylosidase aus. Während die Xylanasen aus *Aspergillus niger* (John et al. 1979) Arabinose abspalten konnten, konnte dies bei dem Enzym aus *B. stearothermophilus* ebensowenig nachgewiesen werden wie

bei der Xylanase eines thermophilen, acidophilen *Bacillus* (Uchino und Nakane 1981) oder aus *Ceratocystis paradoxa* (Dekker und Richards 1975). An Stelle einer Xylanase, die auch Arabinose abspalten kann, synthetisiert *B. stearothermophilus* vermutlich eine Arabinosidase.

Die Xylanase von *B. stearothermophilus* ist wahrscheinlich ein Endoenzym, denn bei der Xylanhydrolyse entstanden zunächst Tetra- und Trimere, die bei fortgesetzter Inkubation weitgehend abgebaut wurden. Das Endproduktspektrum der Xylanhydrolyse mit gereinigter Xylanase von *B. stearothermophilus* ähnelte denen, die mit den Enzymen von *Aspergillus oryzae* (Fukui 1958), *Ceratocystis paradoxa* (Dekker und Richards 1975), *Fusarium avenaceum* (Zalewska-Sobczak und Urbanek 1981) und *B. circulans* (Esteban et al. 1982) erhalten wurden: hauptsächlich Xylobiose, wenig Xylose und Arabinoxylooligosaccharide. Ein Vergleich der Hydrolyseprodukte von Xylan aus Gras (Haferspelzen) bzw. Holz (Birke) zeigte, daß beim Abbau von Birkenxylan der Anteil der größeren Oligomere erhöht und der der Xylobiose erniedrigt war, d. h. daß die Xylanase von *B. stearothermophilus* die zusätzlich vorhandenen Glukuronsäuren des Holzxylans sehr wahrscheinlich nicht abspalten konnte.

Wie die Xylanasen von *Ceratocystis paradoxa* (Dekker und Richards 1975), *Cryptococcus albidus* (Biely et al. 1980) und *B. pumilus* (Panbangred et al. 1983) konnte auch die Xylanase von *B. stearothermophilus* Xylobiose nicht hydrolysieren. Trotzdem konnte wie mit der Xylanase von *Cryptococcus albidus* (Biely et al. 1980) das Xylobiose-Analogon 4-Nitrophenyl-β-D-xylopyranosid (PNXP) abgebaut werden. Nach Biely et al. (1980) handelt es sich dabei nicht nur um eine einfache hydrolytische Spaltung sondern um ein Zusammenspiel von Transglykosylierungen und Hydrolysen der dabei entstehenden Xylooligosaccharide.

Transglykosylierungen wurden schon bei mehreren Carbohydrolasen beobachtet, z. B. bei einer Glukanase (Yamamoto et al. 1981), bei α-Amylasen (Yoshida et al. 1969, Fujimori et al.

1977, Suganuma et al. 1978, Allen und Thoma 1978), bei Lysozym (Chipman et al. 1968, Osawa 1968), bei Cellulasen (Kanda et al. 1983), bei Xylosidasen (Takenishi et al. 1973, Matsuo und Yasui 1981) und auch bei Xylanasen (Biely et al. 1980, Panbangred et al. 1983).
Wallenfels und Weil (1972) und Hehre et al. (1973) postulierten, daß alle Carbohydrasen neben ihrer hydrolytischen auch eine transferierende Eigenschaft haben. Das Verhältnis von Hydrolyse zu Transferreaktion ist sowohl vom pH abhängig (Huber et al. 1983) als auch im Fall der Transglykosylierung von der Anfangskonzentration an Zuckern (Dekker und Richards 1976, Suganuma et al. 1978, Allen und Thoma 1978, Biely et al. 1980).
Dies stützt die Theorie von Wallenfels und Weil (1972), die als Mechanismus für die Katalyse der β-Galaktosidase eine nukleophile Substitutionsreaktion formulierten. Da inzwischen ein kovalentes Enzym-Galaktosyl-Zwischenprodukt nachgewiesen wurde (Kurz et al. 1982), kann man davon ausgehen, daß die β-Galaktosidase zuerst die Glykosidbindung unter Freisetzung von Glukose spaltet. Anschließend wird die noch gebundene Galaktose durch einen nukleophilen Angriff vom Enzym abgelöst. Bei Hydrolysen ist das nukleophile Agens H_2O. Bei hohen Konzentrationen treten Zucker in Konkurrenz zum H_2O und Transglykosylierungen werden häufiger.

Die Cellulasen von *Clostridium thermocellum* (Ng et al. 1977), *Trichoderma viride* (Ooshima et al. 1983) und *Cellulomonas flavigena* (Antheunisse 1984) adsorbieren sehr stark an Cellulose. Antheunisse (1984) beschrieb, daß an Filterpapier gebundene Cellulase erst dann wieder in der Lösung gemessen werden konnte, als das Papier weitgehend abgebaut war. Analog dazu könnte erklärt werden, warum die Xylanase aus *B. stearothermophilus* erst in der späten logarithmischen Wachstumsphase im Kulturfiltrat nachgewiesen werden konnte, denn auch die Xylanase hat eine sehr große Affinität zu ihrem un-

löslichen Substrat. Zusätzlich kann noch eine Bindung an die Zelle in Betracht gezogen werden, wie sie von Srivastava et al. (1981) für die Amylase eines thermophilen *Bacillus* festgestellt wurde. Das Erscheinen der Xylanaseaktivität im Kulturfiltrat erfolgte durch Ablösung von der Zellwand bzw. Vergrößerung der Xylanlöslichkeit durch die Abnahme des Polymerisationsgrads während der Inkubationszeit.
Die Affinität der Xylanase zu ihrem Substrat ist so groß, daß die Zucker durch die üblichen Methoden zur Reinigung von Fremdproteinen nicht abgetrennt werden konnten. Deshalb wurde häufig vermutet, daß es sich bei diesen Enzymen um Glykoproteine handelte. Während dies für die Xylanase aus *Aspergillus niger* (Gorbacheva und Rodionova 1977) wegen der Beteiligung von Glukosamin zutreffen kann, konnte in dieser Arbeit für die Xylanase von *B. stearothermophilus* und von Paice et al. (1978) und Stüttgen (1981) für die Xylanasen von *Schizophyllum commune* bzw. *Trichosporon cutaneum* gezeigt werden, daß die Zucker nicht kovalent gebunden waren, denn sie konnten durch SDS abgelöst werden.

Setzt man das Molekulargewicht der Xylanase von *B. stearothermophilus* zwischen 49000 und 67000 Dalton an, so liegt es im Bereich der Xylanase eines anderen thermophilen *Bacillus, B. caldarius*, mit einem Molekulargewicht nach SDS-Gelelektrophorese von 56000 Dalton (Uchino und Nakane 1981, Uchino und Fukuda 1983). Die entsprechenden Enzyme aus mesophilen Bakterien waren kleiner: *B. subtilis* mit 32000 (Bernier et al. 1983), *B. coagulans* mit 22000 bzw. 26000 (Esteban et al. 1983) und *B. pumilus* mit 24000 bzw. 20000 Dalton (Panbangred et al. 1983).
Die stark voneinander abweichenden Ergebnisse der beiden Bestimmungen des Molekulargewichts der Xylanase von *B. stearothermophilus* können dadurch erklärt werden, daß es sich bei beiden Methoden um Relativmessungen handelt. Die Retentionszeiten von Proteinen in der Gelfiltration werden nicht nur vom Molekulargewicht sondern auch von der äußeren

Form (z. B. Kugel, Faden) bestimmt (Ackers 1975). Ein hitzestabiles Phosphatase-Inhibitor-Protein schien nach einer Gelfiltration ein Molekulargewicht von 60000 zu haben, tatsächlich hatte es eins von 20000 (Price und Stevens 1982). Die relative Wanderstrecke im SDS-Gel hängt von der Anzahl des gebundenen SDS ab, was nicht immer proportional zum Molekulargewicht sein muß (Weber und Osborn 1975).

Die Temperaturoptima der Xylanasen aus Pilzen und Bakterien liegen überwiegend bei 323 K und niedriger (Conrad 1981, Ishaque und Kluepfel 1981, Esteban et al. 1983). Die Xylanase aus *Talaromyces byssochlamydoides* (Yoshioka et al. 1981) hat wie das Enzym von *B. stearothermophilus* ein Optimum um 343 K. Nur die Xylanasen von *B. caldarius* (Uchino und Nakane 1981, Uchino und Fukuda 1983) und *Ceratocystis paradoxa* (Dekker und Richards 1975) haben ein höheres Temperaturoptimum, bei 353 K.
Wie für ein extrazelluläres Enzym eines thermophilen Bakteriums zu erwarten, war die Xylanase von *B. stearothermophilus* sehr stabil bei hohen Temperaturen. Uchino und Nakane (1981) gaben für die Xylanase von *B. caldarius* (Uchino und Fukuda 1983) an, daß nach 15 Minuten bei 343 K noch 100 % der Aktivität zu messen waren. Dekker und Richards (1975) fanden keinen Aktivitätsverlust der Xylanase aus *Ceratocystis paradoxa* nach einer Stunde bei 343 K und Yoshioka et al. (1981) keinen bei *Talaromyces byssochlamydoides* nach fünf Minuten bei 338 K. Die übrigen Xylanasen wurden als sehr instabil bei Temperaturen über 323 K beschrieben (Nakanishi et al. 1976, Conrad 1981, Ishaque und Kluepfel 1981, Bernier et al. 1983).
In der Literatur wurden verschiedene Ursachen für die Temperaturstabilität von Proteinen diskutiert und zwischen „externen" und „internen" Faktoren unterschieden. Bei vielen Enzymen bewirken Metallionen wie Ca^{++}, Mg^{++} oder Zn^{++} eine Stabilitätserhöhung (Merkler et al. 1981). Pfueller und Elliott (1969) und Ogasahara et al. (1970) beschrieben die

Stabilisierung der α-Amylase aus *B. stearothermophilus* durch Ca^{++}, im Gegensatz zu Kindle (1983), die keinen Einfluß von Ca^{++} auf dieses Enzym feststellte. Auch bei der in dieser Arbeit untersuchten Xylanase scheinen Metallionen keine Rolle zu spielen, denn die Stabilitätstests wurden mit einer Enzympräparation durchgeführt, bei der durch den letzten Reinigungsschritt (Gelfiltration bei 333 K) wahrscheinlich alle anhaftenden Salze entfernt worden waren. Außerdem wurden keine Effekte durch zugefügtes Ca^{++} oder EDTA auf die Aktivität gefunden. Auch die Amylase von *B. caldarius* (Uchino 1982, Uchino und Fukuda 1983) wurde von Ca^{++} nicht beeinflußt. Die Xylanase von *B. stearothermophilus* ist temperaturstabil auch ohne den Zusatz von Substrat oder Protein, wodurch manche Enzyme bei höheren Temperaturen stabilisiert werden (Mozhaev und Martinek 1984, Pfueller und Elliott 1969, Ogasahara et al. 1970). Ein Grund für die Temperaturstabilität der Xylanase von *B. stearothermophilus* ist somit nicht in „externen" sondern in „internen" Faktoren, einer besonderen Aminosäurezusammensetzung, zu suchen.

Die Struktur thermophiler Proteine ist bei niedrigen Temperaturen kompakter und rigider als die entsprechender mesophiler. Nach Williams (1975), Argos et al. (1979), Zuber (1979), Zeikus (1979), Crabb et al. (1981) und Merkler et al. (1981) werden Enzyme durch den Austausch einzelner Aminosäuren, der zu engeren Packungen führt, stabilisiert. Im Einklang damit fanden Suzuki und Imai (1982) und Daniel et al. (1982), daß die von ihnen untersuchten thermophilen Proteine bei niedrigen Temperaturen resistent gegen Proteolyse waren, weil weniger Bindungen angreifbar waren.

Die dichtere Packung der thermophilen Proteine wird bewirkt durch Änderungen in der Anzahl der elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen sauren und basischen Aminosäuren, der Wasserstoff- und Disulfidbrücken und der hydrophoben Wechselwirkungen (Mozhaev und Martinek 1984). Die Xylanase von *B. stearothermophilus* wird nicht durch Disulfidbrücken stabilisiert, denn wie vielen anderen thermophilen Proteinen (Moz-

haev und Martinek 1984) fehlt auch ihr Cystein. Die Aktivitätsminderung durch das SH-Gruppenreagenz 4-Chlormerkuribenzoesäure (PCMB) ist vermutlich auf unspezifische Reaktionen zurückzuführen, denn für eine spezifische Hemmung von Cystein sind bereits 10^{-5} m PCMB ausreichend (Trudinger 1969). Bei einer Konzentration von 10^{-3} m PCMB waren jedoch noch 60 % der Xylanaseaktivität vorhanden.
Nach Singleton und Amelunxen (1973) bewirkt eine große Anzahl von hydrophoben Aminosäuren, daß thermophile Enzyme erst bei höheren Temperaturen beweglicher und aktiv werden. Hydrophobe Wechselwirkungen sind die einzigen Kräfte, die bis 343 K zunehmen (Mozhaev und Martinek 1984), d. h. sie können zu einem großen Teil zur Stabilisierung thermophiler Proteine beitragen. Da die Xylanase aus *B. stearothermophilus* eine große Anzahl unpolarer Aminosäuren hat und ihre Temperaturoptimumskurve bei Temperaturen über 338 K abknickt, kommt den hydrophoben Wechselwirkungen sicherlich ein Anteil an der Thermostabilität dieses Enzyms zu.

5. Zusammenfassung

Xylan ist ein Heteropolysaccharid pflanzlicher Zellwände mit einer Hauptkette aus Xylose. Es ist mit einem Anteil von bis zu 30 % am Gesamtkohlenhydratgehalt von Pflanzen eine überall verfügbare Rohstoffquelle. Die enzymatische Hydrolyse von Xylan wird durch den Einsatz temperaturstabiler Proteine wirtschaftlicher.

In einem Screening auf thermophile, Xylan-abbauende Bakterien wurde *Bacillus stearothermophilus* isoliert. Außer auf Xylan wächst dieses Bakterium auf Xylose, Glukose, Glyzerin, Mannit und Stärke, aber nicht auf Dextran 40 oder Cellulose MN 300. Im Temperaturoptimum bei 340 K ist die minimale Verdoppelungszeit 14 und auf Xylan 20 Minuten. Beim Wachstum auf Haferspelzenxylan scheidet *B. stearothermophilus* eine Xylanase und vermutlich eine Xylosidase und eine Arabinosidase aus. Die Xylanase wurde über Hydroxylapatit- und Ionenaustauschchromatographie 40 fach angereichert, mit einer Ausbeute von 50 %.

Die Xylanase von *B. stearothermophilus* ist kein Glykoprotein, hatte jedoch noch einen Kohlenhydratanteil von etwa 60 %, der vermutlich aus Xylan bestand und durch eine Gelfiltration bei 333 K abgetrennt werden konnte.

Das Molekulargewicht der zuckerfreien Xylanase ist mit Gelfiltration 67000 und mit SDS-Gelelektrophorese 49000 Dalton. Wegen des großen Anteils an sauren Aminosäuren liegt der isoelektrische Punkt bei pH 4.9.

Die große Zahl von unpolaren Aminosäuren bewirkt sehr wahrscheinlich die Temperaturstabilität der Xylanase von *B. stearothermophilus*. Nach zwei Stunden bei 338 K konnte kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Die Xylanase ist spezifisch für die Spaltung von β-1,4-glykosidischen Bindungen von Xylan und Xylooligosacchariden mit einem Polymerisationsgrad > 2. Sie kann die Bindung zur Arabinose nicht hydrolysieren. Der Abbau von Xylooligomeren erfolgt über gekoppelte Transglykosylierungs- und Hydrolysereaktionen.

6. Literaturverzeichnis

Ackers GK (1975) Molecular sieve methods of analysis. In: Neurath H, Hill RL, Boeder CL (Hrsg) The proteins I. Academic Press, New York: 1-94

Allen JA, Thoma JA (1978) Multimolecular substrate reactions catalyzed by carbohydrases. *Aspergillus oryzae* α-amylase degradation of maltooligosaccharides. Biochemistry 17: 2338-2344

Allen MB (1953) The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. Bacteriol Rev 17: 125-173

Antheunisse J (1984) Free and cell-bound cellulase activity of *Cellulomonas flavigena*. Antonie van Leeuwenhoek 50: 7-15

Argos P, Rossmann MG, Grau UM, Zuber H, Frank G, Tratschin JD (1979) Thermal stability and protein structure. Biochemistry 18: 5698-5703

Aspinall GO (1983) Classification of polysaccharides. In: Aspinall GO (Hrsg) The polysaccharides 2. Academic Press, New York: 1-9

Babel W, Rosenthal HA, Rapoport S (1972) A unified hypothesis on the causes of the cardinal temperatures of microorganisms; the temperature minimum of *B. stearothermophilus*. Acta Biol Med Germ 28: 565-576

Baker CJ, Whalen CH, Bateman DF (1977) Xylanase from *Trichoderma pseudokoningii*: purification, characterization, and effects on isolated plant cell walls. Phytopathol 67: 1250-1258

Banauch D, Brümmer W, Ebeling W, Metz H, Rindfrey H, Lang H, Leybold K, Rick W (1975) Eine Glukose-Dehydrogenase für die Glukose-Bestimmung in Körperflüssigkeiten. Z Klin Chem Klin Biochem 13: 101-107

Bensadoun A, Weinstein D (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. Anal Biochem 70: 241-250

Berger EG, Buddecke E, Kamerling JP, Kobata A, Paulson JC, Vliegenthart JFG (1982) Structure, biosynthesis and functions of glycoprotein glycans. Experientia 38: 1129-1162

Bernier R, Desrochers M, Jurasek L, Paice MG (1983) Isolation and characterization of a xylanase from *B. subtilis*. Appl Environ Microbiol 46: 511-514

Biely P, Vrsanska M, Kratky Z (1980) Complex reaction pathway of aryl β-xylanase of *Cryptococcus albidus*. Eur J Biochem 112: 375-381

Bisaria VS, Ghose TK (1981) Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme Microb Technol 3: 90-104

Borriss R (1981) Purification and characterization of an extracellular β-glucanase from *Bacillus* IMET B 376. Z Allg Mikrobiol 21: 7-17

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254

Chanda SK, Hirst EL, Jones JKN, Percival EGV (1950) The constitution of xylan from esparto grass (*Stipa tenacissima*, L.). J Chem Soc: 1289-1297

Chipman DM, Pollock JJ, Sharon N (1968) Lysozyme-catalyzed Hydrolysis and transglycosylation reactions of bacterial cell wall oligosaccharides. J Biol Chem 243: 487-496

Claus D (1982) Persönliche Mitteilung

Claus D, Lack P, Neu B (1983) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Catalogue of strains Bacteria, Filamentous Fungi, Yeasts. Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig

Cleland WW (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. Biochemistry 3:480-482

Comtat J (1983) Isolation, properties, and postulated role of some of the xylanases from the Basidiomycete *Sporotrichum dimorphosphorum*. Carbohydr Res 118: 215-231

Conrad D (1981) Enzymatic hydrolysis of xylans 1. A high xylanase and β-xylosidase producing strain of *Aspergillus niger*. Biotechnol Lett 3: 345-350

Crabb JW, Murdock AL, Suzuki T, Hamilton JW, McLinden JH, Amelunxen RE (1981) Sequence homology in the amino-terminal and active-site regions of thermolabile glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a thermophile. J Bacteriol 145: 503-512

Creuzet N, Frixon C (1983) Purification and characterization of an endoglucanase from a newly isolated thermophilic anaerobic bacterium. Biochimie 65: 149-156

Daniel RM, Cowan DA, Morgan HW, Curran MP (1982) A correlation between protein thermostability and resistance to proteolysis. Biochem J 207: 641-644

Dekker RFH, Richards GN (1975) Purification, properties and mode of action of hemicellulase II produced by *Ceratocystis paradoxa*. Carbohydr Res 42: 107-123

Dekker RFH, Richards GN (1976) Hemicellulases: their occurrence, purification, properties and mode of action. Adv Carbohydr Chem 32: 277-352

Dische Z, Borenfreund E (1957) A new color reaction for the determination of aldopentose in presence of other saccharides. Biochim Biophys Acta 23: 639-642

Eriksson KE, Pettersson B (1971) Purification and characterization of xylanase from the rot fungus *Stereum sanguinolentum*. Int Biodeterio Bull 7: 115-119

Esteban R, Villanueva JR, Villa TG (1982) β-D-Xylanases of *B. circulans* WL-12. Can J Microbiol 28: 733-739

Esteban R, Chordi A, Villa TG (1983) Some aspects of a 1,4-β-D-xylanase and a β-D-xylosidase secreted by *B. coagulans* strain 26. FEMS Microbiol Lett 17: 163-166

Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10: 2606-2617

Forsberg CW, Beveridge TJ, Hellstrom A (1981) Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen environment. Appl Environ Microbiol 42: 886-896

Fratzke AR (1975) Enzymatic breakdown of hemicellulose. Proc Biochem Eng Symp Manhattan Kansas: 1-11

Frederick MM, Frederick JR, Fratzke AR, Reilly PJ (1981) Purification and characterization of a xylobiose- and xylose-producing endo-xylanase from *Aspergillus niger*. Carbohydr Res 97: 87-103

Fujimori H, Ohnishi M, Sakoda M, Matsuno R, Hiromi K (1977) Reaction mechanism of saccharifying α-amylase from *B. subtilis* with maltose as a substrate. J Biochem 82: 417-427

Fukui S (1958) Degradation of xylan by the xylanase system of *Aspergillus oryzae* No. 8. J Gen Appl Microbiol 4: 39-50

Gorbacheva IV, Rodionova NA (1977) Studies on xylan degrading enzymes 1.Purification and characterization of endo-1,4-β-xylanase from *Aspergillus niger* Str. 14. Biochim Biophys Acta 484: 79-83

Haigler CH, Benziman M (1982) Biogenesis of cellulose I microfibrils occurs by cell-directed self-assembly in *Acetobacter xylinum*. In: Brown RM (Hrsg) Cellulose and other natural polymer systems. Plenum Press, New York: 273-297

Hamacher K (1983) Persönliche Mitteilung

Hehre EJ, Okada G, Genghof DS (1973) Glycosylation as the paradigm of carbohydrase action. Adv Chem Ser 117: 309-333

Hempfling WP (1981) Energiestoffwechsel des thermophilen Bakteriums *B. stearothermophilus* während kontinuierlicher Kultur im Phauxostat. In: Lafferty RM (Hrsg) Fermentation, 2. Rotenburger Symposium, Bad Karlshafen, September 1980. Springer, Wien: 170-180

Herbert D, Phipps PJ, Strange RE (1971) Chemical analysis of microbial cells. In: Norris JR, Ribbons DW (Hrsg) Methods in microbiology 5 B. Academic Press, London: 209-344

Horikoshi K, Atsukawa Y (1973) Xylanase produced by alkalophilic *Bacillus* No. C-59-2. Agr Biol Chem 37: 2097-2103

Howard BH, Jones G, Purdom MR (1960) The pentosanases of some rumen bacteria. Biochem J 74: 173-180

Huber RE, Gaunt MT, Sept RL, Babiak MJ (1983) Differences in the effects of pH on the hydrolytic and transgalactosylic reactions of β-galactosidase (*Escherichia coli*). Can J Biochem Cell Biol 61: 198-206

Ishaque M, Kluepfel D (1981) Production of xylanolytic enzymes by *Streptomyces flavogriseus*. Biotechnol Lett 3: 481-486

Jaeger E (1980) Untersuchungen zum Abbau von Ligninmodellsubstanzen durch *Rhodococcus erythropolis*. Dissertation, Universität Düsseldorf

John M, Schmidt B, Schmidt J (1979) Purification and some properties of five endo-1,4-β-D-xylanases and a β-D-xylosidase produced by a strain of *Aspergillus niger*. Can J Biochem 57: 125-134

Kanaya K, Chiba S, Shimomura T (1978) Thin-layer chromatography of linear oligosaccharides. Agr Biol Chem 42: 1947-1948

Kanda T, Noda I, Wakabayashi K, Nisizawa K (1983) Transglycosylation activities of exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). J Biochem 93: 787-794

Khym JX, Zill LP (1951) The separation of monosaccharides by ion exchange. J Amer Chem Soc 73: 2399-2400

Kindl H, Wöber G (1975) Biochemie der Pflanzen. Springer, Berlin

Kindle KL (1983) Characteristics and production of thermostable α-amylase. Appl Biochem Biotechnol 8: 153-170

King NJ, Fuller DB (1968) The xylanase system of *Coniophora cerebella*. Biochem J 108: 571-576

Kornfeld R, Kornfeld S (1976) Comparative aspects of glycoprotein structure. Annu Rev Biochem 45: 217-237

Kratky Z, Biely P (1980) Inducible β-xyloside permease as a constituent of the xylan-degrading enzyme system of the yeast *Cryptococcus albidus*. Eur J Biochem 112: 367-373

Krebs KG, Heusser D, Wimmer H (1969) Spray reagents. In: Stahl E (Hrsg) Thin layer chromatography. Springer, Berlin: 854-909

Kurz G, Lehmann J, Vorberg E (1982) Affinity labelling of β-D-galactosidase from *Escherichia coli* with o-Nitrophenyl-β-D-|6-^{3}H|galactopyranoside. Carbohydr Res 110: C21-C24

Laemmli UK, Favre M (1973) Maturation of the head of bacteriophage T 4. J Mol Biol 80: 575-599

Ljungdahl LG (1979) Physiology of thermophilic bacteria. In: Rose AH, Morris JG (Hrsg) Advances in microbial physiology 19, Academic Press, London: 149-243

LKB (1981) Titration curves: combined electrofocussing-electrophoresis in polyacrylamide gels. Application note 319, Bromma

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275

Margaritis A, Merchant R, Yaguchi M (1983) Xylanase, CM-cellulase and avicelase production by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. Biotechnol Lett 5: 265-270

Matsuo M, Yasui T (1981) Hydrolysis of para substituted phenyl-β-D-xylosides by β-xylosidase from *Malbranchea pulchella* var. sulfurea No. 48. Agr Biol Chem 45: 1603-1608

Maurer HR (1971) Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter, Berlin

McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. J Biol Chem 49: 183-192

Merkler DJ, Farrington GK, Wedler FC (1981) Protein thermostability. Int J Peptide Protein Res 18: 430-442

Mozhaev VV, Martinek K (1984) Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. Enzyme Microb Technol 6: 50-59

Nagasaki S, Mori H, Yamamoto S (1981) Characterization of endo-β-1,3-glucanase IV from *Flavobacterium dormitator* var *glucanolyticae* FA-5. Agr Biol Chem 45: 2689-2694

Nakane A (1978) Proteases produced by a proteolytic mutant of *Clostridium botulinum* type E. J Gen Microbiol 107: 85-91

Nakanishi K, Yasui T, Kobayashi T (1976) A preliminary experiment on the xylanase production by *Streptomyces* sp. J Ferment Technol 54: 813-817

Nakanishi K, Yasui T (1980) Kinetic studies on xylanase induction by β-xyloside in *Streptomyces* sp. Agr. Biol Chem 44: 1885-1889

Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi-method for the determination of glucose. J Biol Chem 153: 375-380

Ng TK, Weimer PJ, Zeikus JG (1977) Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. Arch Microbiol 114: 1-7

Ogasahara K, Imanishi A, Isemura T (1970) Studies on thermophilic α-amylase from *B. stearothermophilus*. J Biochem 67: 77-89

Ooshima H, Sakata M, Harano Y (1983) Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on Cellulose. Biotechnol Bioeng 15: 3103-3114

Osawa T (1968) On the transglycosylase activity of lysozyme. Carbohydr Res 7: 217-220

Paice MG, Jurasek L, Carpenter MR, Smillie LB (1978) Production, characterization, and partial amino acid sequence of xylanase A from *Schizophyllum commune*. Appl Environ Microbiol 36: 802-808

Panbangred W, Shinmyo A, Kinoshita S, Okada H (1983) Purification and properties of endoxylanase produced by *B. pumilus*. Agr Biol Chem 47: 957-963

Park YK, Toma M (1974) Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase production. J Gen Appl Microbiol 20: 67-69

Pfueller SH, Elliott WH (1969) The extracellular α-amylase of *B. stearothermophilus*. J Biol Chem 244: 48-54

Prestidge L, Gage V, Spizizen J (1971) Protease activities during the course of sporulation in *B. subtilis*. J Bacteriol 107: 815-823

Price NC, Stevens L (1982) Fundamentals of enzymology. Oxford University Press, Oxford

Priest FG (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev 41: 711-753

Puls J, Sinner M, Dietrichs HH (1978) Trägergebundene xylanolytische Enzyme. Starch/Stärke 30: 294-299

Richards GN, Shambe T (1976) Production and purification of two hemicellulases from *Cephalosporium sacchari*. Carbohydr Res 49: 371-381

Rickard PAD, Laughlin TA (1980) Detection and assay of xylanolytic enzymes in a *Cellulomonas* isolate. Biotechnol Lett 2: 363-368

Righetti PG, Gianazza E (1980) pH-mobility curves of proteins by isoelectric focusing combined with electrophoresis at right angles. Electrophoresis 79. Walter de Gruyter, Berlin

Roncero MIG (1983) Genes controlling xylan utilization by *B. subtilis*. J Bacteriol 156: 257-263

Rowe JJ, Goldberg ID, Amelunxen RE (1975) Development of defined and minimal media for the growth of *B. stearothermophilus*. J Bacteriol 124: 279-284

Salyers AA, Gherardini F, O'Brien M (1981) Utilization of xylan by two species of human colonic *Bacteroides*. Appl Environ Microbiol 41: 1065-1068

Sanchez A, Villanueva JR, Villa TG (1982) *Saccharomyces cerevisiae* secretes 2 exo-β-glucanases. FEBS Lett 138: 209-212

Sandhu DK, Kalra MK (1982) Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. Trans Br Mycol Soc 79: 409-413

Schuerch C (1975) The hemicelluloses. In: Browning BL (Hrsg) The chemistry of wood. Krieger, New York: 191-243

Singleton R, Amelunxen RE (1973) Proteins from thermophilic microorganisms. Bacteriol Rev 37: 320-342

Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. J Biol Chem 195: 19-23

Sonnleitner B, Cometta S, Fiechter A (1982) Growth kinetics of *Thermus thermophilus*. Eur J Appl Microbiol Biotech 15: 75-82

Sonnleitner B, Fiechter A (1983) Advantages of using thermophiles in biotechnological processes: expectations and reality. Trends in Biotechnol 1: 74-80

Sprey B, Lambert C (1983) Titration curves of cellulases from *Trichoderma reesei*: demonstration of a cellulase-xylanase-β-glucosidase-containing complex. FEMS Microbiol Lett 18: 217-222

Sreenath HK, Joseph R (1982) Purification and properties of extracellular xylan hydrolases of *Streptomyces exfoliatus*. Folia Microbiol 27: 107-115

Srivastava RAK, Nigam JN, Pillai KR, Baruah JN (1981) Studies on amylase synthesis by resting cells of thermophilic *Bacillus* sp. Indian J Exp Biol 19: 271-276

Stephen AM (1983) Other plant polysaccharides. In: Aspinall GO (Hrsg) The polysaccharides 2. Academic Press, New York: 97-193

Strobel GA (1963) A xylanase system produced by *Diplodia viticola*. Phytopathol 53: 592-596

Stüttgen E (1981) Untersuchungen zum Xylanabbau durch die Hefe *Trichosporon cutaneum* und Charakterisierung der Xylanase. Dissertation, Universität Düsseldorf

Suganuma T, Matsuno R, Ohnishi M, Hiromi K (1978) A study of the mechanism of action of Taka-amylase A[1] on linear oligosaccharides by product analysis and computer simulation. J Biochem 84: 293-316

Suzuki Y, Imai T (1982) Abnormally high tolerance against proteolysis of an exo-oligo-1,6-glucosidase from a thermophile *B. thermoglucosidius* KP 1006, compared with its mesophilic counterpart from *B. cereus* ATCC 7064. Biochim Biophys Acta 705: 124-125

Takenishi S, Tsujisaka Y, Fukumoto J (1973) Studies on hemicellulases IV. Purification and properties of the β-xylosidase produced by *Aspergillus niger* van Tiegham. J Biochem 73: 335-343

Trudinger PA (1969) Thiol reagents. In: Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (Hrsg) Data for biochemical research. Oxford University Press, London: 388-395

Uchino F (1982) A thermophilic and unusually acidophilic amylase produced by a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. Agr Biol Chem 46:7-13

Uchino F, Fukuda O (1983) Taxonomic characteristics of a thermophilic acidophilic strain of *Bacillus* producing thermophilic acidophilic amylase and thermostable xylanase. Agr Biol Chem 47: 965-967

Uchino F, Nakane T (1981) A thermostable xylanase from a thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. Agr Biol Chem 45: 1121-1127

Wallenfels K, Weil R (1972) β-Galactosidase. In: Boyer PD (Hrsg) The enzymes 7. Academic Press, New York: 617-663

Warburg O, Christian W (1942) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. Biochem Z 310: 384-421

Weber K, Osborn M (1975) Proteins and sodium dodecyl sulfate: molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures. In: Neurath H, Hill RL, Boeder CL (Hrsg) The proteins I. Academic Press, New York: 179-223

Wilkie KCB (1979) The hemicelluloses of grasses and cereals. Adv Carbohydr Chem Biochem 36: 215-264

Williams RAD (1975) Caldoactive and thermophilic bacteria and their thermostable proteins. Sci Prog Oxf 62: 373-393

Yamamoto S, Mori H, Nagasaki S (1981) Action pattern and active site of endo β-1,3-glucanase IV from *Flavobacterium dormitator* var. glucanolyticae FA-5. Agr Biol Chem 45: 2695-2703

Yoshida H, Hiromi K, Ono S (1969) Kinetics and mechanism of transfer action of saccharifying α-amylase of *B. subtilis*. J Biochem (Tokyo) 66: 183-190

Yoshioka H, Chavanich S, Nilubol N, Hayashida S (1981) Production and characterization of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. Agr Biol Chem 45: 579-586

Yutani K (1976) Role of Calcium ion in the thermostability of α-amylase produced from *B. stearothermophilus*. In: Zuber H (Hrsg) Enzymes and proteins from thermophilic microorganisms. Experientia Suppl 26: 91- 103

Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal Biochem 30: 148-152

Zalewska-Sobczak J, Urbanek H (1981) Cellulose and xylan degrading enzymes of *Fusarium avenaceum*. Arch Microbiol 129: 247-250

Zeikus JG (1979) Thermophilic bacteria: ecology, physiology and technology. Enzyme Microb Technol 1: 243-252

Zuber H (1979) Thermophile Bakterien. Chemie in unserer Zeit 13: 165-175

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Sahm für die Überlassung des Themas und die freundliche und großzügige Unterstützung der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Instituts für Biotechnologie I, die durch ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ferner Herrn Dr. Conrad (IBT II, KFA Jülich) für die Xylooligomere und Frau Löslein (GBF, Braunschweig) für die Aminosäureanalyse.

Lebenslauf

8.7.1955	Geburt in Höxter-Lüchtringen
1962 bis 1966	Besuch der Volksschule Lüchtringen
1966 bis 1974	Besuch des König-Wilhelm-Gymnasiums in Höxter mit Abitur
Oktober 1974 bis März 1980	Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
Mai 1977	Diplom-Vorprüfung Biologie
März 1980	Diplom-Hauptprüfung Biologie Hauptfach: Biochemie/Biophysik Nebenfächer: Botanik und organische Chemie Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Trebst, Lehrstuhl Biochemie der Pflanzen der Ruhr-Universität Bochum
seit Januar 1981	Arbeit an vorliegender Dissertation bei Prof. Dr. H. Sahm, Institut für Biotechnologie I der Kernforschungsanlage Jülich